



Echecs virologiques au sein de cohortes hospitalières de patients adultes infectés par le VIH : apport de l'ultra-deep sequencing et étude des charges virales de faible niveau persistantes

Marie-Anne Vandenhende

► To cite this version:

Marie-Anne Vandenhende. Echecs virologiques au sein de cohortes hospitalières de patients adultes infectés par le VIH : apport de l'ultra-deep sequencing et étude des charges virales de faible niveau persistantes. Santé publique et épidémiologie. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0143 . tel-01275716

HAL Id: tel-01275716

<https://theses.hal.science/tel-01275716>

Submitted on 18 Feb 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ECOLE DOCTORALE SOCIÉTÉS, POLITIQUES, SANTÉ PUBLIQUE

SPECIALITÉ SANTÉ PUBLIQUE

Présentée et soutenue publiquement

Le 24 novembre 2015

Par

Marie-Anne VANDENHENDE

**Echecs virologiques au sein de cohortes hospitalières de patients adultes infectés par le
VIH : Apport de l'ultra-deep sequencing et étude des charges virales de faible niveau
persistantes**

Directeur de Thèse : Professeur Philippe MORLAT

Membres du jury

Professeur Dominique COSTAGLIOLA, Université Paris 06	Présidente
Professeur Jacques IZOPET, Université Toulouse III	Rapporteur
Professeur Cécile GOUJARD, Université Paris Sud	Rapporteur
Professeur Jean-Luc PELLEGRIN, Université Bordeaux	Membre

Titre : Echecs virologiques au sein de cohortes hospitalières de patients adultes infectés par le VIH : Apport de l'ultra-deep sequencing et étude des charges virales de faible niveau persistantes.

Résumé :

L'objectif d'un traitement antirétroviral (ARV) est d'obtenir une charge virale VIH plasmatique indétectable afin de réduire la morbi-mortalité associée au VIH.

La résistance du virus aux ARV est un facteur de risque d'échec virologique (EV). Les tests génotypiques de résistance par séquençage classique (méthode de Sanger) ne permettent pas de détecter les virus porteurs de mutations de résistance (MR) présents à taux minoritaire représentant moins de 20% de la population virale plasmatique. Dans notre étude (cohorte ANRS CO3), l'utilisation de l'ultra-deep sequencing (UDS) a permis de détecter 1.4 fois plus de MR avant traitement et 1.3 fois plus à l'EV en comparaison à la technique de séquençage classique, confirmant la haute sensibilité de l'UDS pour la détection des MR. Les MR minoritaires détectées uniquement par UDS augmentaient la résistance génotypique du virus au traitement ARV chez 4% des patients à l'initiation du traitement et 21% des patients à l'EV.

Les conséquences des épisodes de charges virales de faible niveau persistantes (CVF) entre 50 et 200 copies/ml (CVF50-200) ne sont pas clairement établies du fait de l'insuffisance de données dans la littérature. Dans nos études de cohortes (cohortes ANRS CO3 et ART-CC), 4-9% des patients ont présenté au moins un épisode de CVF50-200. La survenue d'une CVF50-200 était associée à un risque plus de 2 fois plus élevé d'EV>200 copies/ml, quels que soient la durée de la CVF, l'historique de traitement ou le traitement ARV lors de la CVF50-200 (régimes comportant des INNTI ou des IP/r). La survenue d'une CVF n'était pas associée à la survenue d'un événement classant SIDA ni au décès, avec toutefois un suivi médian de 3 ans.

Mots-clés : VIH, étude de cohorte, échec virologique, mutation de résistance minoritaire, ultra-deep sequencing, charge virale de faible niveau persistante

Title: Virological failure in cohorts of HIV-infected patients: Contribution of ultra-deep sequencing and impact of persistent low-level viremia.

Abstract:

The goal of antiretroviral therapy (ART) is to reach undetectable plasma HIV viral load in order to reduce HIV-related morbidity and mortality.

The presence of ART-resistant virus can compromise the efficiency of these treatments, resulting in virological failure (VF). Standard genotyping by Sanger sequencing (SS) used currently in clinical practice cannot detect low-frequency viral variants harbouring drug resistance associated mutations (DRM) representing less than 20% of the viral population. In our study, the use of ultra-deep sequencing (UDS) allowed us to detect 1.4-fold more DRMs before ART and 1.3-fold more DRMs at VF compared to SS, confirming the high sensitivity of UDS for the detection of DRMs. The low-frequency DRMs detected only by UDS modified the genotypic resistance of the virus to the prescribed treatment for 4% of the patients before ART initiation and for 21% of the patients at VF.

The impact of persistent low-level viremia (LLV) between 50 and 200 copies/ml (LLV50-200) remains uncertain due to the lack of controlled comparison data. In our cohort studies (ANRS CO3 and ART-CC cohorts), 4-9% of HIV-infected patients experienced at least one episode of LLV50-200. LLV50-200 was strongly associated with a twice higher risk of VF>200copies/ml, independently of the duration of LLV, the history of treatment or the type of ART regimen at LLV (NNRTI or PI-based regimens). LLV was not associated with AIDS event or death with a median follow-up of only 3 years.

Keywords: HIV, cohort study, virological failure, low-frequency mutations, ultra-deep sequencing, low-level viremia

Unité de recherche

Centre INSERM U897 – Epidémiologie et Biostatistique – Equipe interne Infection par les virus VIH-1 et VIH-2 et maladies associées – ISPED – Université de Bordeaux, 146 rue Léo-Saignat 33076 Bordeaux Cedex (Directeur : Madame le Professeur Geneviève CHENE)

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Philippe Morlat

Je vous remercie sincèrement d'avoir bien voulu diriger ce travail de thèse, et pour votre aide, votre rigueur et surtout votre patience tout au long de ces années. J'espère avoir été à la hauteur de vos attentes et soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

A Madame le Professeur Dominique COSTAGLIOLA

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Madame le Professeur Cécile GOUJARD et Monsieur le Professeur Jacques IZOPET

Je vous suis particulièrement reconnaissante d'avoir accepté de juger ce travail de thèse et d'en être les rapporteurs. Je vous remercie sincèrement pour vos remarques pertinentes et vos conseils qui m'ont permis d'améliorer ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Jean-Luc PELLEGRIN

Je vous remercie d'avoir une nouvelle fois accepté de juger ce travail de thèse, quelques années après avoir jugé mon travail de thèse de médecine. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

A Madame le Professeur Geneviève CHENE

Je vous remercie sincèrement pour votre aide tout au long de l'élaboration et l'avancée de ce travail de thèse. Soyez assurée de mon profond respect et de ma reconnaissance.

Je remercie l'Ecole des Hautes Etudes de Santé Publique de m'avoir accordé un contrat doctoral d'un an (octobre 2012-septembre 2013), et la sous-commission de la CME du CHU de Bordeaux (Développement Professionnel Continu) de m'avoir accordé une aide financière à la mobilité, me permettant de réaliser une mobilité d'un an à l'Université de Bristol.

A Jonathan Sterne, Margaret May et Sue Ingle, pour votre accueil chaleureux et votre soutien tout au long de mon séjour à Bristol, et pour m'avoir fait découvrir les joies de Stata.

A ma famille, à mes parents, ma sœur, mon frère, ma grand-mère, Nicolas, Wenjuan,...

A Manu, pour ton amour, ta présence, ta patience et ton soutien sans faille, pour tout ce bonheur que tu m'apportes au quotidien, et pour tellement de choses que je ne peux résumer en quelques lignes....

A Amandine, pour nos pauses clopes et nos Lucifer, pour cette amitié que nous partageons et qui m'est précieuse.

A Sabrina, pour notre amitié et tout ce que nous avons partagé.

A Fabrice, qui a su dès le début de mon internat me communiquer sa passion pour la médecine puis pour la recherche, tout au long de mon clinicat et de mes premières années de PH. Travailler à tes cotés et profiter de ton expérience, ton humanité et ton amitié sont toujours un privilège.

A toute l'équipe de 26, travailler avec vous est un plaisir et un privilège, à Gridou, Laurence, Cécile, Soaz, Delphine, Yo, Colin, Aurélie, Nathalie, Nelly ... vous êtes devenus au fil des années plus des amis que des collègues, merci de votre soutien et de votre amitié qui me touchent profondément.

A Katell, Peggy, Jennifer, que j'aimerais voir plus souvent et que je n'oublie pas

A Pantxika Bellecave et Patricia Pinson pour m'avoir fait découvrir les joies de l'UDS, pour tous ces moments partagés afin de réussir à maîtriser Junior ! A Bernard Masquelier sans qui ce projet n'aurait peut-être jamais vu le jour et qui restera à jamais dans nos pensées...

A Arthur et Clémence, pour avoir permis à ma vie de prendre ce virage magique...

A tous ceux que j'oublie et qui j'espère ne m'en voudront pas....

SOMMAIRE

<u>ABREVIATIONS</u>	9
----------------------------------	---

<u>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX</u>	11
---	----

<u>INTRODUCTION</u>	14
----------------------------------	----

<u>PARTIE I : Apport de l'Ultra-Deep Sequencing (UDS) dans l'étude des mutations de résistance sous un traitement antirétroviral de première ligne (Cohorte régionale ANRS CO3 Aquitaine)</u>	18
--	----

A. Contexte.....	18
B. Objectifs.....	21
C. Matériel et méthodes.....	22
1. Population étudiée.....	22
2. Réalisation des tests génotypiques de résistance.....	23
2.1. Séquençage classique selon la méthode de Sanger.....	24
2.2. Ultra-Deep Sequencing (UDS).....	26
2.3. Interprétation des tests génotypiques.....	32
3. Méthodes statistiques.....	32
D. Résultats.....	33
E. Discussion.....	46
F. Conclusion.....	54

Article : *Prevalence and Evolution of Low-Frequency HIV-1 Drug Resistance Mutations Detected by Ultra-Deep Sequencing in HIV-1 Infected Patients Experiencing First-Line Antiretroviral Therapy Failure. PLoS One. 2014 Jan 27;9(1):e86771.*

PARTIE II : Impact pronostique d'une charge virale de faible niveau persistante sur l'évolution virologique et clinique (Cohorte régionale ANRS CO3 Aquitaine et Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration ART-CC).....56

A.	Contexte.....	56
B.	Impact pronostique d'une charge virale de faible niveau persistante sur l'évolution clinique et virologique (Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration, 1997-2012).....	61
I.	Objectif de l'étude.....	61
II.	Méthodologie de l'étude.....	61
III.	Résultats.....	66
1.	Population de l'étude et caractéristiques des CVF.....	66
2.	Evolution clinique: survenue d'un évènement classant SIDA ou d'un décès.....	69
3.	Evolution virologique : survenue d'un EV \geq 500 copies/ml.....	73

Article: *Impact of low-level viremia on clinical and virological outcomes in treated HIV-1 Infected Patients. AIDS. 2015 Jan 28;29(3):373-83*

C.	Impact pronostique d'une charge virale de faible niveau persistante sur l'évolution virologique (Cohorte ANRS CO3 Aquitaine, 2000-2011)	78
I.	Objectif de l'étude.....	78
II.	Méthodologie de l'étude.....	78
III.	Résultats.....	83
1.	Population de l'étude et caractéristiques des CVF50-200.....	83
2.	Evolution virologique : survenue d'un EV \geq 200 copies/ml.....	86

Article: *Risk of virological failure in HIV-1 infected patients experiencing low-level viremia under active antiretroviral therapy (ANRS C03 cohort study). Antiviral Therapy 2015 Mar 4, epub ahead of print*

D.	Impact pronostique d'une charge virale de faible niveau persistante sur l'évolution virologique (Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration, 1997-2012).....	90
I.	Objectif – Méthodologie de l'étude.....	90
II.	Résultats.....	91
1.	Population de l'étude et caractéristiques des CVF50-200.....	91
2.	Evolution virologique : survenue d'un EV \geq 200 copies/ml.....	95
E.	Discussion	99
F.	Conclusion	110
	<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	112

ABREVIATIONS

ANRS : Agence nationale de recherche sur le sida et les hépatites virales

ART-CC : Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration

ARV : Antirétroviral

CV : Charge virale

CVF : Charge virale de faible niveau persistante

EC : Evènement clinique : premier évènement clinique classant SIDA (stade C de la classification CDC) ou décès du patient.

EV : Echec virologique

GECSA : Groupe d'Epidémiologie Clinique du Sida en Aquitaine

GSS : Genotypic Sensitivity Score

HR : Hazard Ratio

HSH : Homme ayant des relations sexuelles avec des hommes

IAS : International AIDS Society

IC: Intervalle de confiance

INTI : Inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse

INNTI : Inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse

INI : Inhibiteur de l'intégrase

IP/r: Inhibiteur de protéase boosté par du ritonavir

FTC : Emtricitabine

3TC : Lamivudine

ISPED : Institut de Santé Publique, d'Epidémiologie et de Développement

IQR/IIQ : Interquartile Range/Intervalle interquartile

LISQ : Limite inférieure du seuil de quantification

MR : Mutation de résistance

MRM : Mutation de résistance minoritaire

OR : Odds ratio ou rapport de cotes

PA : Patients-années

PCR : Polymerase Chain Reaction

PPT : Plasma Preparation Tubes

PVVIH : Patients vivant avec le VIH

RT : Reverse transcriptase ou Transcriptase inverse

SS : Séquençage Sanger

T0 : Initiation du traitement ARV

UDI : Usager de drogues intraveineuses

UDS : Ultra-Deep Sequencing

VRM : Variants résistants minoritaires

LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURES

Figure 1 : Schéma représentant un amplicon avec les séquences adaptateur, clé et MID

Figure 2 : Etape 2: Amplification clonale d'un amplicon lié à une microbille

Figure 3 : Etape 3: Pyroséquençage

Figure 4 : Mutations de résistance (MR) aux antirétroviraux détectées par séquençage

Figure 5 : Sélection des patients inclus – étude ART-CC

Figure 6: Incidence cumulée des événements cliniques (événements classant SIDA/décès) selon la survenue d'une CVF et le niveau de la CVF - Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration 1997-2011

Figure 7: Incidence cumulée des échecs virologiques selon la survenue d'une CVF et le niveau de la CVF - Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration 1997-2011

Figure 8: Schéma de l'étude Aquitaine ANRS CO3

Figure 9: Incidence cumulée des échecs virologiques selon la survenue d'une CVF50-200 - Cohorte ANRS CO3 Aquitaine 2000-2011

Figure 10: Incidence de l'échec virologique selon la survenue d'une CVF50-200 - Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration 1997-2011

TABLEAUX

Tableau 1: Amorces utilisées pour la génération des amplicons

Tableau 2 : Caractéristiques des 29 patients inclus

Tableau 3 : Liste des mutations de résistance (MR) détectées avant traitement (T0) et à l'échec virologique (EV) par séquençage Sanger (SS) et Ultra-Deep Sequencing (UDS) pour les patients en EV sous un traitement antirétroviral (ARV) comportant un IP (N=15)

Tableau 4 : Liste des mutations de résistance (MR) détectées avant traitement (T0) et à l'échec virologique (EV) par séquençage Sanger (SS) et Ultra-Deep Sequencing (UDS) pour les patients en EV sous un traitement antirétroviral (ARV) comportant un INNTI (N=6) ou uniquement des INTI (N=8)

Tableau 5: Caractéristiques des patients à l'inclusion (N=17902)

Tableau 6: Analyses univariées et multivariées selon le modèle de Cox de la survenue d'un événement clinique (événement classant SIDA/décès) selon la survenue d'une CVF (Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration 1997-2011)

Tableau 7: Analyses univariées et multivariées selon le modèle de Cox de la survenue d'un événement clinique (événement classant SIDA/décès) parmi les patients exposés à un épisode de CVF (N=1106, Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration 1997-2011)

Tableau 8: Analyses univariées et multivariées selon le modèle de Cox de la survenue d'un échec virologique ($2\text{ CV} \geq 500$ copies/ml) selon la survenue d'une CVF (Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration 1997-2011)

Tableau 9: Analyses univariées et multivariées selon le modèle de Cox de la survenue d'un échec virologique parmi les patients exposés à un épisode de CVF (N=1106, Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration 1997-2011)

Tableau 10: Caractéristiques des patients à l'inclusion (N=2374)

Tableau 11: Analyses univariées et multivariées par régression logistique des facteurs de risque de survenue d'une CVF50-200 (Cohorte ANRS CO3 Aquitaine 2000-2011)

Tableau 12: Analyses univariées et multivariées selon le modèle de Cox de la survenue d'un échec virologique ($2\text{ CV} \geq 200$ copies/ml) selon la survenue d'une CVF (Cohorte ANRS CO3 Aquitaine 2000-2011)

Tableau 13: Caractéristiques des patients à l'inclusion (N=17902)

Tableau 14: Analyses univariées et multivariées par régression logistique des facteurs de risque de survenue d'une CVF50-200 (Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration 1997-2011)

Tableau 15: Analyses univariées et multivariées selon le modèle de Cox de la survenue d'un échec virologique ($2\text{ CV} \geq 200$ copies/ml) selon la survenue d'une CVF (Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration 1997-2011)

INTRODUCTION

L'apparition des multithérapies antirétrovirales (ARV) a permis une diminution considérable de la morbidité et de la mortalité associée au VIH [1]. Les progrès concernant la prise en charge thérapeutique des patients vivant avec le VIH (PVVIH) se sont poursuivis ces dernières années, avec notamment le développement de nouvelles molécules plus puissantes et mieux tolérées, et la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'infection par le VIH est ainsi devenue une infection chronique qui, à défaut d'être éradiquée, peut être contrôlée. Ainsi, en France en 2011, la réplication virale est contrôlée avec une charge virale (CV) < 50 copies/ml chez 88% des patients sous traitement ARV depuis au moins 6 mois [2], et avec une diminution significative du taux d'échec virologique (2 CV > 50 copies/ml) de 22.1% en 2006 à 10.1% en 2011 [3].

Le principal objectif du traitement ARV est ainsi de réduire au maximum la charge virale afin de stopper la progression de la maladie (réduction de la mortalité et morbidité classant ou non classant SIDA), en maintenant ou en restaurant au mieux et le plus précocement possible les fonctions immunitaires du patient. Le maintien d'une CV indétectable permet également d'éviter la sélection de souches virales résistantes, facteur essentiel au maintien de l'efficacité du traitement, et diminuer le risque de transmission du virus.

L'échec virologique résulte généralement d'une inhibition suboptimale de la réplication virale, secondaire à une puissance insuffisante du traitement. Celle-ci peut être liée à une concentration insuffisante des molécules ARV (défaut d'observance, interactions médicamenteuses...), à l'existence de résistances (infection par un virus résistant ou développement de résistances sous traitement) vis-à-vis d'une ou plusieurs molécules ARV, et/ou à un défaut de puissance intrinsèque du traitement ARV pour les molécules les plus anciennes. Le développement de molécules plus puissantes et mieux tolérées et l'amélioration des associations thérapeutiques

ont ainsi permis une diminution au fil du temps du taux d'échec virologique [2-4] mais aussi de la prévalence de la résistance du virus aux molécules ARV [5-8], la résistance aux ARV constituant un facteur de risque indépendant d'échec thérapeutique [9,10] et de mortalité [11].

Une recherche de mutation de résistance doit donc être réalisée avant d'initier un premier traitement ou en cas d'échec virologique afin d'optimiser la prise en charge thérapeutique [2]. Les tests actuellement réalisés en pratique clinique sont des tests génotypiques basés sur le séquençage selon la méthode de Sanger des gènes ciblés par les ARV, à la recherche de mutations connues comme associées à une résistance. Bien que ces tests soient fiables, ils ne peuvent détecter et analyser les populations virales minoritaires représentant moins de 20% de la population virale globale plasmatique [12]. D'autres techniques plus sensibles ont donc été développées pour analyser ces variants minoritaires, notamment l'Ultra-Deep Sequencing (UDS) [13]. L'utilisation de ces techniques de séquençage plus sensibles a conduit à mettre en évidence une prévalence nettement plus élevée de variants viraux résistants, aussi bien chez les patients naïfs [14-18] que chez les patients en échec virologique sous traitement [19-24]. La signification clinique de ces variants minoritaires résistants et leur impact thérapeutique éventuel reste toutefois à préciser [25].

La notion de charge virale indétectable - objectif virologique optimal du traitement - a évolué au fil du temps avec les techniques de quantification de la charge virale, dont le seuil est actuellement en 2015 de l'ordre de 20-50 copies/ml en routine. Quatre à 10% des patients VIH sous traitement ARV présentent des épisodes de virémies détectables de faible niveau persistantes, entre 50 et 500 copies/ml [26-30]. Si le maintien d'une CV indétectable reste la situation optimale, on ne peut toutefois pas affirmer aujourd'hui qu'une charge virale de faible niveau persistante (CVF) constitue un échec virologique devant conduire inéluctablement à une modification thérapeutique. Il n'existe en 2015 aucun consensus quant à l'attitude thérapeutique à adopter devant cette situation de CVF < 200 copies/ml du fait d'un manque de données dans

la littérature [2,31]. En effet, les recommandations d'experts nationales et internationales sur la prise en charge des PVVIH concluent que les conséquences d'une répllication virale confirmée entre 50 et 200 copies/ml ne sont pas clairement démontrées, ne permettant pas d'établir des recommandations générales pour la prise en charge thérapeutique des patients présentant des épisodes de CVF entre 50 et 200 copies/ml [31,32]. De plus amples données notamment sur les conséquences virales, immunitaires et cliniques d'une faible répllication virale persistante sont nécessaires.

Les conséquences attendues de notre travail sont la contribution à l'amélioration de la prise en charge thérapeutique des patients infectés par le VIH par :

- la mise en place d'une technique d'ultra-deep sequencing qui serait utilisable en routine au laboratoire de virologie et la comparaison des résultats obtenus par cette technique à ceux obtenus par les tests de séquençage classique
- une meilleure connaissance des conséquences cliniques et virologiques de la survenue d'une charge virale de faible niveau persistante

Notre travail de thèse est divisé en plusieurs parties :

- Partie I : Apport de l'Ultra-Deep Sequencing (UDS) dans l'étude des mutations de résistance sous un traitement antirétroviral de première ligne (Cohorte régionale ANRS CO3 Aquitaine)
- Partie II : Impact pronostique d'une charge virale de faible niveau persistante sur l'évolution virologique et clinique (Cohorte régionale ANRS CO3 Aquitaine et Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration)

Ce travail a été réalisé dans l'unité de recherche INSERM U897, en collaboration avec le laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux et de l'UMR 5234 de l'Université de Bordeaux, et l'Université de Bristol (School of Social and Community Medicine - Pr Jonathan Sterne).

**PARTIE I : APPORT DE L'ULTRA-DEEP SEQUENCING DANS L'ETUDE DES
MUTATIONS DE RESISTANCE SOUS UN TRAITEMENT ANTIRETROVIRAL DE
PREMIERE LIGNE (COHORTE AQUITAINE ANRS CO3)**

A. CONTEXTE

L'apparition des multithérapies antirétrovirales a permis une diminution considérable de la morbidité et de la mortalité associée au VIH [1]. Cependant, l'efficacité des ARV peut être compromise par l'apparition de résistance à ces traitements. La résistance aux ARV constitue un facteur de risque indépendant d'échec thérapeutique [9,10] et de mortalité [11]. Cette résistance est liée à la sélection de variants VIH comportant des mutations dans les gènes de la transcriptase inverse, de la protéase, de la gp41, de la gp120 ou de l'intégrase, lorsque la réplication virale persiste en présence d'ARV. La sélection de mutations de résistance (MR) dépend de facteurs pharmacologiques (concentrations plasmatiques suboptimales d'ARV consécutives à des difficultés d'observance ou à des interactions médicamenteuses), de la puissance intrinsèque du traitement ARV et de la barrière génétique du virus (nombre de mutations nécessaires à l'apparition d'une résistance et difficulté à sélectionner ces mutations) vis-à-vis des différents ARV. Plusieurs facteurs sont connus pour être associés à l'apparition de mutations de résistance, notamment le taux de lymphocytes T CD4+ à la mise sous traitement, la charge virale (CV) VIH plasmatique à la mise sous traitement et surtout l'observance du patient à la prise d'antirétroviraux [33,34].

Selon les dernières études épidémiologiques, 8-11% des patients naïfs d'ARV en Europe et aux Etats-Unis seraient infectés par un virus porteur de MR aux ARV [35,36]. Une recherche de MR doit donc être réalisée, selon les recommandations actuelles, au moment du diagnostic d'infection par le VIH ou avant d'initier un premier traitement ARV, et de manière

systématique en cas d'échec virologique (EV) afin d'adapter le traitement et d'optimiser la prise en charge thérapeutique [2,31].

Il existe 2 types de tests de résistance, les tests phénotypiques et les tests génotypiques. Les tests actuellement réalisés en pratique clinique sont des tests génotypiques permettant de rechercher les mutations associées aux résistances présentes dans les gènes de la transcriptase inverse, de la protéase, de l'intégrase, de la boucle V3 de la gp120 ou de la gp41. Le génome viral est amplifié par RT-PCR à partir de l'ARN plasmatique puis un séquençage des gènes selon la méthode de Sanger est réalisé sur séquenceurs automatiques. Des logiciels traduisent les séquences nucléotidiques en acides aminés et la lecture s'effectue en analysant chaque position connue comme associée à des MR, par rapport à une séquence de référence. Ces tests sont ensuite interprétés à l'aide d'algorithmes (règles d'interprétation des tests génotypiques) notamment les algorithmes du groupe Résistance de l'ANRS ou celui de l'université de Stanford, réactualisés tous les 6-12 mois, permettant de classer le virus en catégories sensible, potentiellement résistant ou résistant pour chaque molécule ARV.

Bien que ces tests soient fiables, ils ne peuvent détecter et analyser les populations virales minoritaires représentant moins de 15 à 25% de la population virale globale plasmatique [12]. Les patients ne sont pas infectés par un virus identique mais, du fait de la variabilité importante du virus, par une population de virions hétérogènes, définissant la quasi-espèce virale. Les variants résistants ayant souvent une capacité répliquative plus faible que les souches sauvages, ils peuvent n'être présents que sous forme minoritaire notamment en l'absence de pression de sélection médicamenteuse, et donc ne pas être détectables par les méthodes de séquençage classique [12].

D'autres tests génotypiques de résistance plus sensibles ont été développés pour détecter ces variants résistants minoritaires (VRM) comme la PCR spécifique d'allèle (allele-specific PCR ou AS-PCR) [37], le séquençage à une copie [38] et le séquençage ultrasensible ou Ultra-Deep

Sequencing (UDS) [13], ces méthodes permettant d'atteindre une sensibilité de 0.1 à 1% pour la détection des variants minoritaires. La PCR spécifique d'allèle nécessite une analyse séparée des différentes mutations, ce qui en limite l'intérêt. Le séquençage à une copie, basé sur le séquençage de multiples clones moléculaires, n'est pas réalisable en routine. L'UDS a une sensibilité de l'ordre de 0.1 à 1% pour la détection des variants minoritaires, permet la quantification de ces variants et d'avoir une longueur de fragment relativement importante pour détecter plusieurs MR sur le même fragment (haplotypage). Cette technique semble constituer la technique la plus appropriée pour une éventuelle utilisation en routine.

L'utilisation de ces techniques de séquençage plus sensibles a conduit à mettre en évidence une prévalence nettement plus élevée de variants viraux résistants par rapport à la technique de séquençage classique selon la méthode de Sanger, aussi bien chez le patient naïf [14-18,39,40] que chez le patient en EV sous traitement [19-24,41].

Néanmoins, la pertinence clinique des VRM détectés par UDS, notamment leur rôle dans la survenue d'un EV, reste encore incertaine [25]. Plusieurs études ont retrouvé une association entre la présence de VRM avant traitement et la survenue d'un EV [18,39,42-45]. Metzner *et al.* [43] ont retrouvé que les VRM détectés avant traitement pouvaient rapidement, du fait de la pression de sélection liée au traitement, devenir la population majoritaire et entraîner un EV précoce à un traitement de première ligne, notamment en cas de régime thérapeutique à faible barrière génétique. Une méta-analyse publiée en 2011 montre clairement l'impact négatif des VRM sous un traitement de première ligne comportant un INNTI de première génération avec un risque d'EV plus de 2 fois supérieur en cas de VRM aux INNTI [46]. D'autres auteurs ne retrouvent toutefois pas cette association, notamment avec des régimes thérapeutiques comportant des IP boostés [15,18,47-49].

La signification clinique des VRM et notamment leur impact thérapeutique éventuel nécessitent donc des études complémentaires, en utilisant des méthodes permettant la recherche de

l'ensemble des mutations. Parmi les techniques ultrasensibles permettant leur détection, l'UDS permet d'analyser un grand nombre de mutations avec une sensibilité élevée [13,18].

B. OBJECTIFS

Les objectifs de ce travail étaient de :

- Réaliser une étude comparative des techniques de séquençage classique (Sanger) et haut débit (Ultra-Deep Sequencing ou UDS) pour la détection des mutations de résistance (avant traitement et à l'EV) chez des patients en EV sous un traitement ARV de première ligne
- Etudier la prévalence des mutations de résistance minoritaires avant traitement puis à l'EV et leurs conséquences sur le profil de résistance du patient, et analyser leur évolution sous traitement ARV

C. MATERIEL ET METHODES

1- Population étudiée :

L'étude a été réalisée en utilisant les données de la Cohorte ANRS CO3 Aquitaine. Cette cohorte ouverte prospective régionale et multicentriques (13 centres localisés en Aquitaine) a été initiée en 1987 par le Groupe d'Epidémiologie Clinique du Sida en Aquitaine (GECSA). Les principaux critères d'inclusion sont : patients infectés par le VIH-1, quel que soit le stade clinique, vus au moins deux fois en consultation ou en hospitalisation, âgés d'au moins 13 ans à l'inclusion et ayant signé un consentement écrit éclairé (8677 patients inclus au 30 juin 2013 dont 3541 en file active). Un questionnaire permet la collecte confidentielle et standardisée des données cliniques, biologiques, thérapeutiques et épidémiologiques lors de chaque consultation ou hospitalisation. Le Centre de Recherche INSERM U897, au sein de l'Institut de Santé Publique, d'Epidémiologie et de Développement (ISPED) de l'Université de Bordeaux assure la coordination épidémiologique de la Cohorte Aquitaine.

La population étudiée répondait aux critères d'inclusion suivants :

- patients infectés par le VIH inclus dans la cohorte ANRS CO3 Aquitaine
- naïfs de traitement ayant débuté un premier traitement ARV entre le 1er janvier 2000 et le 30 juin 2009
- présentant un EV, défini par la survenue, au moins 6 mois après l'initiation du traitement ARV, d'au minimum une CV > 1000 copies/ml ou 2 CV consécutives > 500 copies/ml sous traitement ARV, que les patients aient été ou non répondeurs au traitement ARV dans les 6 mois suivant l'introduction du traitement avant l'échec virologique. La date de l'EV était définie par la date de la 1ere CV > 1000 copies/ml ou de la 2^{ème} CV > 500 copies/ml.

- n'ayant pas modifié ni arrêté leur traitement ARV avant le premier EV
- ayant des prélèvements disponibles à l'EV et à l'initiation du traitement (T0)

Les caractéristiques des patients (l'âge, le sexe, le groupe de transmission, la charge virale VIH avant traitement et à l'EV et le type de traitement pris par le patient) ont été extraites de la base de données de la cohorte. Le sous-type du virus a été déterminé lors de la réalisation du test génotypique de résistance par séquençage classique avant l'initiation du traitement. L'ensemble des patients avaient donné un consentement écrit à leur inclusion dans la cohorte Aquitaine.

2- Réalisation des tests génotypiques de résistance

Les tests génotypiques de résistance ont été réalisés dans le laboratoire de virologie du Pr Fleury du CHU de Bordeaux et de l'UMR 5234 (CNRS, Microbiologie fondamentale et Pathogénicité) de l'Université de Bordeaux.

Une recherche de MR par test génotypique a été réalisée chez tous les patients avant l'initiation du traitement et à l'EV

- par séquençage classique (Sanger) selon la technique de séquençage recommandée par l'ANRS (<http://www.hivfrenchresistance.org>), utilisée en routine au laboratoire de virologie
- par UDS pour l'analyse des variants résistants minoritaires.

Les résultats obtenus ont ensuite été interprétés à l'aide de l'algorithme du groupe Résistance de l'ANRS de 2012 (<http://www.hivfrenchresistance.org>).

2.1. Séquençage classique selon la méthode de Sanger

La procédure se déroule en plusieurs étapes :

- Les ARN viraux plasmatiques ont été extraits avec le kit High Pure Viral RNA (Roche Diagnostics) après centrifugation de 1 ml de plasma à 23500 g pendant 1h à 4°C.

- Ces ARN viraux ont été rétro-transcrits en ADN complémentaire par RT-PCR.

Cette étape a été réalisée à l'aide du kit Titan One Tube RT-PCR (Roche). Cinq µl d'ARN viraux plasmatiques extraits ont été ajoutés au milieu réactionnel contenant 10µl de tampon 5x, 5mM de DTT, 0,2 mM de chaque désoxyribonucleotide triphosphate (dNTP), 20 pmoles d'amorces forward et reverse (5P1- 5'TAATTTTTTTAGGGAAGATCTGGCCTCC3' et 3P1- 5'GCAAATACTGGAGTATTGTATGGATTTTCA3' pour le gène de la protéase; pour le gène de la RT : MJ3-5'AGTAGGACCTACACCTGTCAAC3' et MJ4- 5'CTGTTAGTGCTTTGGTTCCTCT3'), 5U de RNase Inhibitor et 1 µl d'Enzyme mix. Le programme de PCR utilisé était: 50°C pendant 30 minutes; 94°C pendant 2 minutes; 40 cycles x (94°C pendant 30 secondes; 55°C pendant 30 secondes; 68°C pendant 1 minute 30 secondes); 68°C pendant 7 minutes.

- Les gènes de la reverse transcriptase (RT) et de la protéase ont ensuite été amplifiés par PCR nichée.

Deux µl des produits de RT-PCR ont été utilisés pour effectuer une PCR nichée utilisant le kit AmpliTaq Gold (Applied Biosystems). Le milieu réactionnel contenait 10µl de tampon 10x, 2,5mM de MgCl₂, 0,2mM de chaque dNTP, 20 pmoles d'amorces forward et reverse (pour le gène de la protéase : 5P2-5'TCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCA3' et 3P2- 5'AATGCTTTTATTTTTTCTTCTGTCAATGGC3'; pour le gène de la RT ; A35- 5'TTGGTTGCACTTTAAATTTTCCCATAGTCCTATT3' et NE35- 5'CCTACTAACTTCTGTATGTCATTGACAGTCCAGCT3'), et 2 U d'AmpliTaQ ADN

polymérase. Le programme d'amplification par PCR utilisé était: 94°C pendant 12 minutes; 40 cycles x (94°C pendant 30 secondes; 55°C pendant 30 secondes; 72°C pendant 2 minutes); 72°C pendant 7 minutes. La qualité et la taille des produits de la PCR ont été évaluées par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5%. Les produits de la PCR ont été purifiés sur des micro-colonnes séphadex de type MicroSpin TM S-400 HR (Amersham Biosciences) afin d'éliminer entre autres les amorces non utilisées et les dNTPs libres.

- Après amplification par PCR nichée, les gènes de la RT et de la protéase ont ensuite été séquencés selon la méthode de Sanger sur séquenceur automatique Beckman 2000 XL selon la technique de séquençage de l'ANRS (www.hivfrenchresistance.org).

Les réactions de séquences bidirectionnelles ont été réalisées dans un volume final de 20 µl comprenant 10 µl de produit de PCR purifié (correspondant aux gènes de la RT et de la protéase amplifiés par PCR nichée), 0.8 µM d'amorces (A35, NE35, 5P2 ou 3P2) et 8 µl de Dye Terminator Cycle Sequence Quick Start mix (GenomeLab™ DTCS kit, Beckman Coulter) contenant les composants nécessaires à la réaction de séquence notamment les dNTP et les didésoxyribonucléosides couplés au fluorochrome (ddNTP*). Le programme d'amplification par PCR utilisé était le suivant : 30 cycles de 20 secondes à 96°C, 20 secondes à 50°C, 4 minutes à 60°C. Les produits de séquençage obtenus ont été purifiés sur une plaque Millipore contenant des billes de séphadex G-50 (Sigma-Aldrich) puis dénaturés avec 25 µl de Sample Loading Solution (GenomeLab™ DTCS kit, Beckman Coulter) contenant de la formamide. Le séquençage a ensuite été réalisé par un séquenceur automatique à 8 capillaires GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System (Beckman Coulter) et la lecture des séquences nucléotidiques générées a été effectuée avec le GenomeLab™ GeXP Software.

2.2. Ultra-Deep Sequencing (UDS)

Les gènes de la RT et de la protéase ont été séquencés selon la procédure mise au point par la société 454 Life Sciences/Roche technology, basée sur l'amplification clonale d'ADN lié à une bille en émulsion et sur le pyroséquençage [50].

Cette procédure se déroule en plusieurs étapes :

➤ Etape 1 : Génération d'une banque d'ADN par amplification des gènes de la RT et de la protéase du VIH :

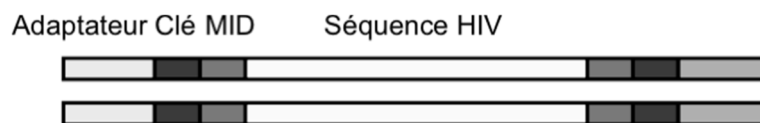
- Après extraction des ARN viraux plasmatiques (kit High Pure Viral RNA de Roche Diagnostics), une étape de reverse transcription a été réalisée par RT-PCR afin de générer 3 ADN complémentaires couvrant les régions protéase et RT du VIH. Pour cela, 11.5 µl d'ARN plasmatiques extraits ont été préalablement dénaturés 10 min à 65°C en présence des amorces correspondantes (BR-HIVB, 4R-HIVB ou 5R-HIVB). La reverse transcription a été effectuée selon les recommandations de Roche pendant 1h à 50°C. Après inactivation de la RT 5 min à 85°C, l'ARN matrice a été dégradé par de la RNase H.
- Les 3 ADN complémentaires générés ont ensuite été utilisés comme matrices pour générer par PCR 8 amplicons (de 200 à 420 bp environ). Ces amplicons ont été générés avec le kit « FastStart High Fidelity PCR System » et les amorces fournies par Roche selon les recommandations de la compagnie.

Chaque amplicon est constitué de l'ADN spécifique à séquencer, encadré à chaque extrémité par 3 séquences (Figure 1) correspondant à :

- un adaptateur qui va permettre la fixation d'amorces spécifiques pour la réalisation de la PCR en émulsion,
- une clé de 4 nucléotides servant de « contrôle qualité » des séquences

- et un MID (Multiplex IDentifier) commun aux 8 amplicons d'un échantillon et donc spécifique d'un patient donné. L'utilisation de 9 à 12 MID spécifiques à chaque échantillon (le même étant utilisé pour les 8 amplicons d'un patient) permet ensuite de réaliser un pool de 9 à 12 échantillons séquencés en parallèle.

Figure 1 : Schéma représentant un amplicon avec les séquences adaptateur, clé et MID



A noter qu'à cette étape, devant les mauvais résultats préliminaires obtenus pour le séquençage des amplicons prévus dans la procédure élaborée par la société « 454 Life Science », nous avons décidé de générer nos propres amplicons au laboratoire de virologie (1 amplicon au lieu de 3 pour la protéase et 3 amplicons au lieu de 5 pour la RT).

- Pour cela, à partir des ARN plasmatiques extraits, nous avons réalisé une amplification par RT-PCR de la région *Pol* (localisation sur la souche VIH-1 de référence HxB2: 2082-3420) en utilisant le kit « SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase » (Invitrogen, Carlsbad, CA) et les amorces 5P1 et MJ4. Le programme de PCR utilisé était: 50°C pendant 30 minutes; 94°C pendant 2 minutes; 40 cycles x (94°C pendant 30 secondes; 55°C pendant 30 secondes; 68°C pendant 1 minute 30 secondes); 68°C pendant 7 minutes.
- Deux µl du produit de RT-PCR ont été utilisés pour générer nos 4 amplicons (Prot, RT1, RT2 and RT3) couvrant les régions RT et protéase, encadrés à leurs extrémités de l'adaptateur, de la clé et d'un MID (Figure 1). Les amorces utilisées sont décrites dans le Tableau 1. La PCR nichée pour générer ces amplicons a été effectuée en utilisant le kit

« FastStart High Fidelity PCR System (Roche Diagnosis)» avec le programme de PCR suivant : 94°C pendant 3 minutes; 40 cycles x (94°C pendant 30 secondes; 55°C pendant 45 secondes; 72°C pendant 60 secondes); 72°C pendant 8 minutes.

Tableau 1: Amorces utilisées pour la génération des amplicons

Amplicon	Localisation sur HxB2	Amorces (5'-3')
Prot	2136-2164	TCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCA
	2621-2650	AATGCTTTTATTTTCTTCTGTCAATGGC
RT1	2530-2564	TTGGTTGCACTTTAAATTTTCCCATTAGCCCTATT
	2988-3012	CTTCCATCCCTGTGGAAGCACATT
RT2	2706-2734	GAAAATCCATACAATACTCCAGTATTTGC
	3119-3145	CTATGCTGCCCTATTTCTAAGTCAGAT
RT3	2874-2891	CTRGATGTGGGTGATGCA
	3265-3284	CNYTATAGGCTGTACTGTCC

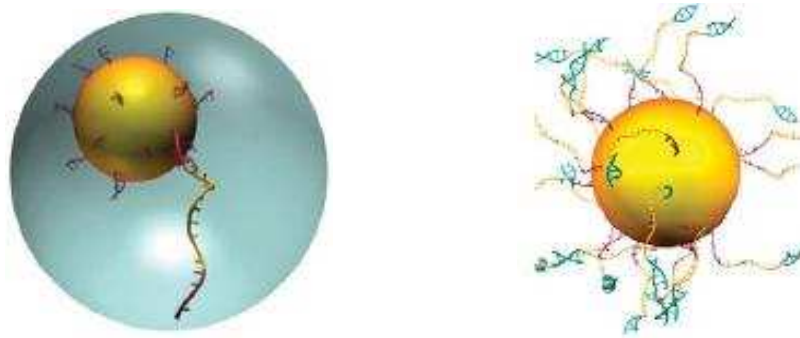
- Les amplicons obtenus ont ensuite été purifiés sur billes magnétiques avec le kit Agencourt AMPure (Beckman Coulter and Benried, Germany) pour éliminer les dimères d'amorces. Ils ont ensuite été quantifiés en utilisant le kit « Quant-iT™ Picogreen dsDNA Assay Kit » (Invitrogen, Carlsbad, CA). La fluorescence émise par le Picogreen a été mesurée sur LightCycler 2.0 à 530 nm et la concentration en amplicons déterminée après report de la valeur de fluorescence sur une courbe standard. Un pool des 4 amplicons à concentration molaire équivalente égale à 1.10^9 molécules/ μ l a ensuite été réalisé. Une fois encore, l'utilisation de 9 à 12 MID spécifiques à chaque échantillon (le même étant utilisé pour les 4 amplicons d'un échantillon d'un patient) a permis ensuite de réaliser un pool de 9 à 12 échantillons séquencés en parallèle.

➤ Etape 2 : Amplification clonale des amplicons par PCR en émulsion (Figure 2):

Pour la PCR en émulsion, nous avons utilisé des microbilles présentant en surface des amorces complémentaires à un des adaptateurs présents sur les amplicons, ce qui permet de fixer une seule molécule d'ADN simple brin (un seul amplicon) par microbille.

Ces microbilles ont été mises en émulsion en présence des réactifs pour PCR (Live Amp mix, Roche) et des amplicons, résultant en la formation de gouttes. Chaque goutte englobe une microbille et donc un seul amplicon permettant l'amplification clonale de cet amplicon. Cette PCR en émulsion a été réalisée en utilisant le kit « GS Junior Titanium emPCR Kit, Lib-A, Roche » selon le protocole de Roche. A la fin de la PCR, l'émulsion a été détruite et les billes contenant les amplicons amplifiés récupérées (Vacuum-Assisted Emulsion Breaking Set Up, Roche).

Figure 2 : Etape 2: Amplification clonale d'un amplicon lié à une microbille [50]



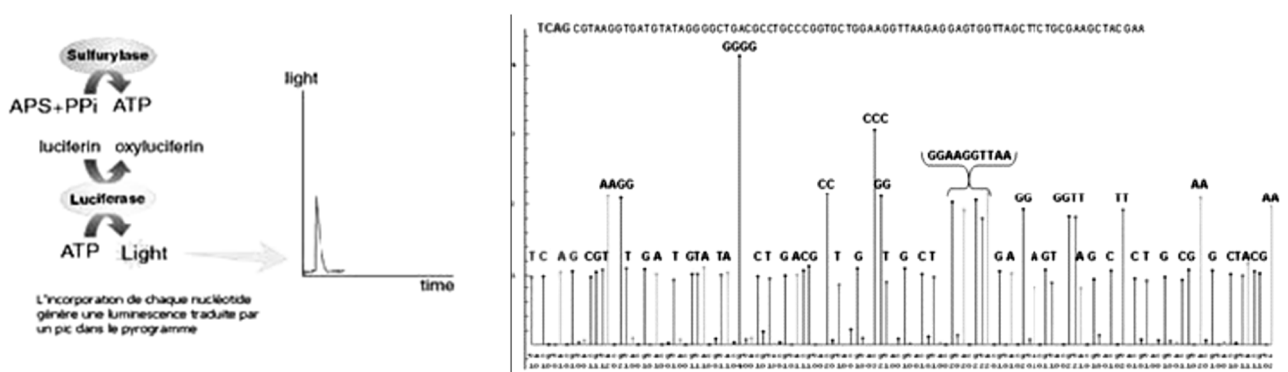
Ces billes recouvertes d'ADN ont ensuite été mélangées à des billes magnétiques (Enrichment beads, Roche) et par interaction streptavidine-biotine, les billes porteuses d'ADN ont été retenues aux billes magnétiques et les billes vides éliminées. Cette étape permet d'éviter une compétition entre les billes vides et les billes chargées d'ADN lors de la préparation de la plaque optique.

➤ Etape 3 : Pyroséquençage (Figure 3):

Les microbilles porteuses de l'amplicon amplifié de manière clonale ont été pipetées dans une plaque en fibre optique (contenant 1,4 millions de puits) suivies des enzymes nécessaires au pyroséquençage. Les puits possèdent un diamètre qui assure le dépôt d'une seule microbille par puits. Avec ce système, 100000 réactions de séquençage peuvent se faire en parallèle. La plaque a été insérée dans le 454 Life Science Roche GS Junior et le run de séquençage lancé.

Pour rappel, dans le pyroséquençage, les nucléotides (sous forme de dNTP) sont ajoutés l'un après l'autre. Si le nucléotide ajouté est complémentaire du nucléotide du brin matrice, il est incorporé dans le brin en cours de synthèse et un pyrophosphate inorganique (PPi) est libéré. L'ATP sulfurylase transforme le pyrophosphate libéré en ATP, utilisé par une luciférase qui génère un signal lumineux proportionnel à la quantité d'ATP. La caméra CCD du séquenceur capte le signal lumineux après addition de chaque nucléotide et le traduit par un pic sur le pyrogramme. La hauteur du pic est proportionnelle à l'intensité du signal lumineux, elle-même proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés au même moment. On déduit la séquence à partir de la taille des pics obtenus. En cas de mélange de nucléotides à une même position (polymorphisme de séquence), la taille des pics permet d'avoir une quantification de la proportion de brins porteurs de l'un ou l'autre des nucléotides.

Figure 3 : Etape 3: Pyroséquençage [50]



➤ Etape 4 : Analyse des séquences:

Connaissant l'ordre dans lequel les 4 nucléotides sont ajoutés automatiquement, l'analyse des différentes images capturées permet la déduction de la séquence des différents amplicons.

Les données brutes générées par le 454 Life Science Roche GS Junior ont été traitées par le logiciel bio-informatique Amplicon Variant Analyser (AVA 2.7) développé par Roche. Les séquences nucléotidiques obtenues sont traduites en acides aminés. La séquence protéique a ensuite été comparée à une séquence de référence (souche de référence VIH-1 HxB2), en analysant les positions connues comme associées à des mutations de résistance.

Ce logiciel permet de plus de quantifier le nombre de séquences porteuses de mutations de résistances, afin de calculer le pourcentage de VRM. Les VRM étaient considérés comme valables s'ils étaient présents à un taux $> 1\%$ du nombre total de lectures dans les 2 sens.

Nous avons estimé le taux d'erreur de notre protocole UDS en calculant le pourcentage d'erreurs générées par les 2 étapes de PCR (RT-PCR par Platinum Taq Polymerase suivi de l'amplification par PCR par FastStart High Fidelity polymerase) et par le pyroséquençage d'un plasmide de contrôle contenant la souche de référence VIH-1 LAV (pNL4.3). Le taux moyen d'erreur a été calculé en réalisant l'expérience trois fois et en calculant le pourcentage de variations en comparaison à la séquence de référence. Le taux moyen d'erreur a été estimé à $0.21 \pm 0.07\%$ (nombre moyen de lecture par position: 3007 ± 1477), avec $0.07 \pm 0.06\%$ de délétions et $0.12 \pm 0.07\%$ d'insertions, soit nettement inférieur à notre seuil de 1% . Ces valeurs sont comparables au taux d'erreurs générées par la FastStart High Fidelity polymerase [51].

2.3. Interprétation des tests génotypiques

Les séquences nucléotidiques obtenues par Séquençage Sanger (SS) et UDS ont été traduites en acides aminés. La séquence protéique a ensuite été comparée à une séquence de référence, en analysant les positions connues comme associées à des mutations de résistance (et en déterminant le pourcentage de MR minoritaires pour l'UDS). Les mutations analysées connues comme étant associées à une résistance aux INTI, INNTI et aux IP étaient celles référencées dans la liste de l'IAS de 2011 (2011 International AIDS Society (IAS)–USA drug resistance mutations list [52]).

Les résultats obtenus après séquençage par Sanger et UDS ont ensuite été interprétés à l'aide de l'algorithme v22 du groupe Résistance de l'ANRS de 2012 (<http://hivfrenchresistance.org>) afin de déterminer la résistance globale aux ARV et la résistance au traitement prescrit au patient, en calculant le score GSS (Genotypic Sensitivity Score). Ce score est déterminé en calculant la somme des scores obtenus pour chaque molécule ARV prescrite au patient lors du test de résistance (les molécules ARV considérées comme ayant une activité totale, intermédiaire ou nulle sur le virus ont un score respectivement de 1, 0.5 ou 0 pour les IP, 1, 0 ou 0 pour les INNTI et 0.5, 0 ou 0 pour les INTI [53]).

3. Méthodes statistiques

Le nombre moyen de MR (MR vis-à-vis de toute molécule ARV, MR associées aux INTI, aux INNTI et aux IP) détectées par SS et le nombre moyen de MR détectées par UDS ont été comparés en utilisant le test de Student (logiciel Stata, version 12.0, College Station, Texas). La différence observée entre les 2 techniques était jugée significative si $p < 0.05$.

D. RESULTATS

Les caractéristiques des 29 patients inclus dans notre étude sont présentées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Caractéristiques des 29 patients inclus

Caractéristiques	
Sexe masculin, n (%)	23 (79.3%)
Age médian, années (IQR)	36.8 (33.0-39.4)
Groupe de transmission, n (%)	
HSH	13 (44.8%)
UDI	5 (17.3%)
Hétérosexuelle	9 (31.0%)
Autres	2 (6.9%)
Période d'introduction du traitement ARV, n (%)	
< 2003	17 (58.6%)
≥ 2003	12 (41.4%)
Type de traitement ARV, n (%)	
2 INTI	3 (10.3%)
3 INTI	5 (17.2%)
2 ou 3 INTI + IP	5 (17.2%)
2 ou 3 INTI + IP/r	10 (34.5%)
2 INTI + INNTI	6 (20.8%)
CV VIH médiane à T0, log₁₀ copies/ml (IQR)	5.0 (4.6-5.2)
Taux médian de CD4 à T0, cellules/mm³ (IQR)	248 (177-314)
CV VIH médiane à l'EV, log₁₀ copies/ml (IQR)	3.7 (3.3-4.0)
Durée médiane entre T0 et l'EV, mois (IQR)	14.3 (8.7-24.2)

CV : charge virale, IQR: interquartile range, ARV: Antirétroviral, HSH: homme ayant des relations sexuelles avec des hommes, UDI : usager de drogues intraveineuses, INTI : inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse, INNTI : inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse, IP/r: inhibiteur de protéase boosté par du ritonavir, T0 : date d'initiation du traitement ARV

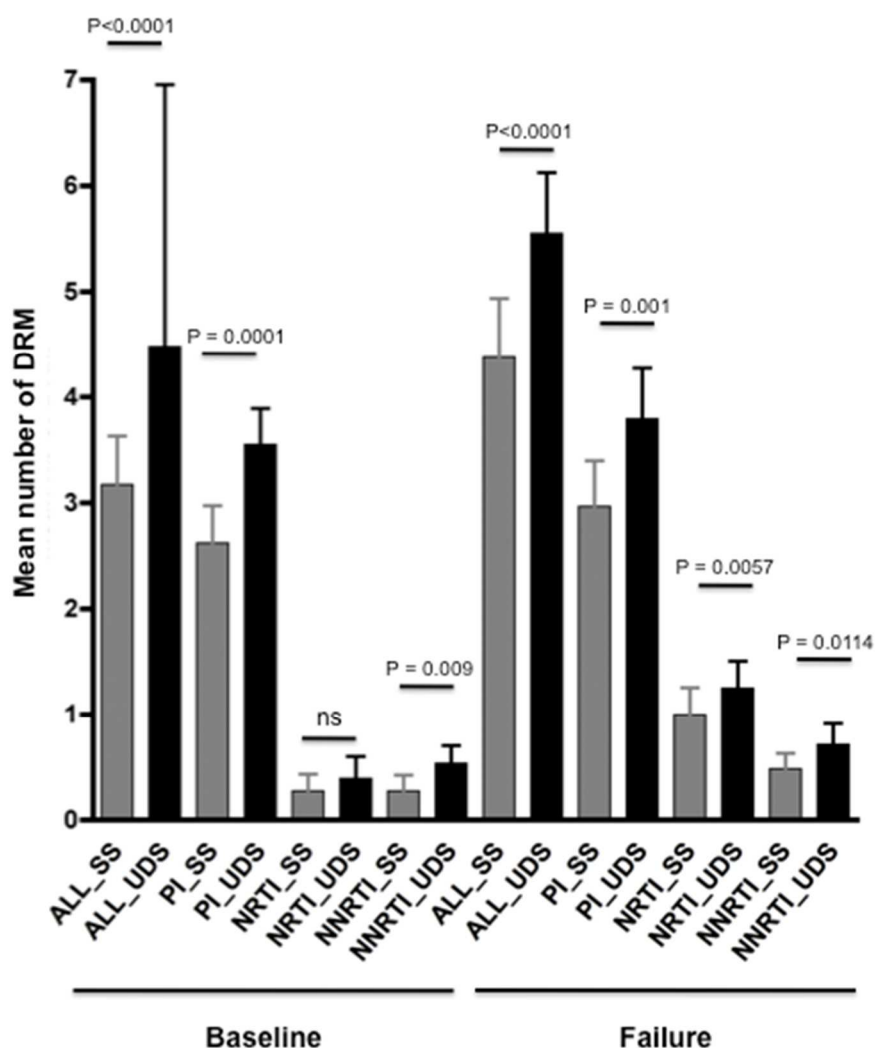
Tests génotypiques de résistance

Un test génotypique de résistance par SS et par UDS a été réalisé à T0 sur le dernier échantillon disponible avant l'introduction du traitement ARV (durée médiane entre la date du prélèvement et la date de début du traitement ARV : 28 jours, IQR: 8-91) et sur l'échantillon à la date de l'EV. Les UDS réalisés sur l'ARN VIH à T0 ont produit une médiane de 1663 lectures (IQR: 1017-2533) par amplicon, et les UDS réalisés sur l'ARN VIH à l'EV ont produit une médiane de 1739 lectures (IQR: 1123-2583) par amplicon. L'UDS des gènes de la RT et de la protéase a été réalisé avec succès à T0 et à l'EV pour les 29 patients sauf pour un patient pour lequel le gène de la RT n'a pas pu être séquencé par UDS à T0 et à l'EV. Le SS a échoué pour le gène de la RT chez un patient à T0.

La comparaison du nombre moyen de MR détectées par patient (Figure 4) a retrouvé que 1.35 fois plus de MR était détectées par UDS que par SS (1.4 fois plus à T0 et 1.3 fois plus à EV, $p < 0.001$), confirmant la plus grande sensibilité de l'UDS pour la détection des MR. Toutes les MR détectées par SS ont également été détectées par UDS.

Des MR minoritaires (MRM) complémentaires ont été retrouvées par UDS chez 21/29 patients à T0 et 18/29 patients à EV. La différence entre le nombre moyen de MR détectées soit par SS soit par UDS était statistiquement significative pour les MR associées aux IP (MR-IP) et aux INNTI (MR-INNTI) à T0 et pour les MR associées aux 3 classes d'ARV à EV.

Figure 4 : Mutations de résistance (MR) aux antirétroviraux détectées par séquençage Sanger (SS) et Ultra-Deep Sequencing (UDS)



DRM (Drug resistant mutations): Mutations de résistance aux antirétroviraux; Baseline: avant traitement ARV; Failure: à l'échec virologique; ALL_SS and ALL_UDS: toute MR détectées par SS et UDS respectivement; PI_SS and PI_UDS: MR aux inhibiteurs de protéase détectées par SS et UDS respectivement; NRTI_SS and NRTI_UDS: MR aux inhibiteurs nucléosidique de la transcriptase inverse détectées par SS et UDS respectivement; NNRTI_SS and NNRTI_UDS: MR aux inhibiteurs non nucléosidique de la transcriptase inverse détectées par SS et UDS respectivement; ns: non statistiquement significatif ($p > 0.05$)

Mutations de résistance avant l'introduction du traitement ARV (Tableaux 3 et 4)

Quelques définitions pour un peu plus de clarté dans la présentation des résultats :

Une recherche de mutation de résistance a donc été réalisée par SS et par UDS. Parmi ces mutations, certaines MR ont été détectées à la fois par SS et par UDS (car elles étaient présentes à taux majoritaires), d'autres n'ont été détectées que par UDS (car présentes à taux minoritaires, d'où leur désignation comme mutations de résistance minoritaires ou MRM).

De plus, les MR aux IP sont définies en 2 groupes : les MR primaires ou majeures, et les MR secondaires ou accessoires (qui en s'accumulant permettent de renforcer la résistance, et peuvent parfois correspondre à des mutations polymorphiques selon le sous-type du virus).

Par ailleurs, la barrière génétique du virus vis-à-vis des différents ARV (c'est-à-dire le nombre de MR nécessaires pour que le virus soit résistant au traitement ARV) est variable. Présence d'une MR ne veut pas forcément dire résistance au traitement. Cette résistance dépend du type de MR, des MR additionnelles présentes et du type d'ARV. Ainsi certaines MR à un traitement présentes de façon isolée entraînent une résistance au traitement (et donc une diminution du GSS du patient), alors que d'autres nécessitent d'être associées à d'autres MR additionnelles pour entraîner une résistance au traitement. Nous avons ainsi décrit :

- l'ensemble des MRM au traitement (futur traitement pour celles détectées à T0 ou traitement prescrit pour celles détectées à l'EV), ces MRM n'entraînant pas forcément une résistance au traitement si présentes de façon isolée
- les MRM qui par leur présence (de façon isolée ou en complément avec d'autres MR déjà présentes) entraînaient une résistance génotypique théorique au traitement (futur ou en cours) et donc une diminution du GSS. Toutefois, ces MRM décrites étant

présentes à taux minoritaire et leur impact étant encore incertain dans la littérature, nous avons préféré utiliser l'expression « pouvant entraîner une résistance au traitement ».

Enfin, nous avons également regardé si ces MRM pouvaient théoriquement entraîner une résistance à un ARV, que cet ARV soit ou non celui prescrit au patient, ce que nous avons décrit comme « résistance génotypique globale » à au moins un ARV.

Prévalence des MR avant traitement (T0)

Le test génotypique par SS réalisé avant traitement a mis en évidence des MR-IP chez la plupart des patients mais ces MR correspondaient à des mutations accessoires sauf pour le patient 4 dont le virus présentait une MR majeure aux IP. Des MR associées aux INTI (MR-INTI) ont été mises en évidence chez 13.8% (4/29) des patients et des MR-INNTI chez 17.2% (5/29) des patients.

Le test génotypique par UDS a mis en évidence de façon additionnelle des MRM associées aux IP (MRM-IP), aux INTI (MRM-INTI) et aux INNTI (MRM-INNTI) chez respectivement 51.7% (15/29, dont 1 MRM majeure aux IP soit 3.4%), 10.7% (3/28) et 25.0% (7/28) des patients. A noter que des MRM aux INNTI de seconde génération ont été retrouvées chez 21.4% (6/28) des patients, correspondant à des MR polymorphiques à l'Etravirine (V90I, V106I) chez 4 patients et à des MR à la Rilpivirine (E138G) chez 2 patients. Au total, 21/29 patients étaient infectés par un virus présentant au moins une MRM détectée par UDS uniquement.

Ces MRM étaient des mutations décrites comme associées à une résistance génotypique globale à au moins un ARV chez 4 sur 29 patients (13.8%).

Relation entre les MR minoritaires à T0 et le futur traitement ARV prescrit

Parmi les 21 patients avec des MRM détectées à T0, 8 étaient infectés par un virus présentant des MRM au futur traitement ARV. Néanmoins, seul un patient (Patient 61) présentait une diminution de son score de sensibilité (GSS) vis-à-vis de son futur traitement en raison d'une MRM (détection d'une mutation Y181C à 2.1% pouvant entraîner une résistance à son traitement par INNTI).

Mutations de résistance à l'échec virologique (Tableaux 3 et 4)

Prévalence des MR à EV

Le test génotypique par SS réalisé à l'EV a mis en évidence des MR chez 20/29 patients. Des MR-IP accessoires ont été retrouvées chez la plupart des patients, mais des MR-IP majeures ont été retrouvées chez 17.2% des patients (5/29). Des MR-INTI et des MR-INNTI ont été mises en évidence chez respectivement 58.6% (17/29) et 34.5% (10/29) des patients.

Le test génotypique par UDS a mis en évidence de façon additionnelle des MRM-IP accessoires, des MRM-IP majeures, des MRM-INTI et des MRM-INNTI chez respectivement 44.8% (13/29), 10.3% (3/29), 25% (7/28) and 21.4% (6/28) des patients. Au total, 18/29 patients étaient infectés par un virus présentant au moins une MRM détectée par UDS uniquement.

Ces MRM étaient des mutations décrites comme associées à une résistance génotypique globale à au moins un ARV chez 9 sur 29 patients (31%).

Relation entre les MR minoritaires à l'EV et le traitement ARV prescrit

Parmi les 18 patients avec des MRM détectées à l'EV, 12 étaient infectés par un virus présentant des MRM au traitement ARV prescrit.

Ces MRM pouvaient entraîner une résistance au traitement prescrit chez 6/29 patients (20.7%), avec un GSS basé sur l'UDS (GSS à l'EV par UDS) plus faible que leur GSS basé sur le SS (GSS à l'EV par SS) :

- Les patients 14, 49 et 69 présentaient dans leur population virale 4.3% de M184I, 2.7% et 3.8% de M184V respectivement, pouvant entraîner une résistance à leur traitement par Lamivudine
- Les patients 46 et 86 présentaient dans leur population virale 3% de L74V et 34.9% de Y115F respectivement, pouvant entraîner une résistance à leur traitement par Abacavir
- Le patient 40 présentait 5% de virus porteur de la mutation L10V pouvant entraîner, en complément avec les 5 autres MR détectées à taux majoritaire (par UDS et par SS), une résistance complète au Lopinavir

En tenant compte de l'ensemble des MR détectées (minoritaires et majoritaires), 8 patients (patients 16, 23, 25, 28, 31, 41, 47 et 85) étaient porteurs d'un virus ne présentant aucune résistance au traitement prescrit à l'EV, et 4 étaient porteurs d'un virus ne présentant même aucune MR vis-à-vis du traitement à l'EV (Patients 16, 28, 47 et 85).

Evolution des MR minoritaires entre T0 et l'EV

MR minoritaires au futur traitement ARV détectées à T0 et évolution à l'EV

Parmi les 38 MRM détectées à T0, 9 étaient des MRM au futur traitement ARV prescrit (chez 8 patients). Parmi elles, 1/5 MRM-IP (patient 23), 2/3 MRM-INTI (patients 25 et 80), et 1/1 MRM-INNTI (patient 61) ont également été détectées à l'EV. Parmi les 5 MRM au futur traitement ARV prescrit non retrouvées à l'EV, 4 correspondaient à des MRM accessoires aux IP (patients 16, 23, 52 et 79) et 1 à une MRM de type TAM aux INTI présente de façon isolée (patient 82, MRM L210W).

Chez l'unique patient (Patient 61) présentant une MRM à T0 pouvant entraîner une résistance à son futur traitement (mutation Y181C à 2.1% et traitement par INNTI), cette MR était retrouvée à l'échec virologique à taux majoritaire par SS et par UDS (97.4%).

MR détectées à l'EV présentes à taux minoritaire à T0

La plupart des MR (SS et UDS confondues) détectées à l'EV n'étaient pas détectées avant traitement, ni par SS ni par UDS à taux minoritaire.

Des MR-INTI ont été mises en évidence à l'EV chez 21/28 patients (75%), principalement la MR M184I/V. Parmi les 26 patients traités par Emtricitabine (FTC) ou Lamivudine (3TC), 14 étaient infectés par un virus porteur de la mutation M184I/V à taux majoritaire (détectée par UDS et SS), et 3 par un virus portant de la mutation M184I/V à taux minoritaire (détectée par UDS seulement). Néanmoins, cette MR n'était jamais retrouvée avant traitement ni par SS ni par UDS.

Des MRM-INTI de type TAM ont été retrouvées à taux majoritaire à l'EV chez 5 patients, ces MR étaient présentes à taux minoritaire avant traitement chez 2 d'entre eux (4% et 2.5% de M41L, Patients 25 et 80).

Parmi les 4 patients avec des MR-INNTI à l'EV, seul 1 (Patient 61) avait une MR détectée avant traitement à taux minoritaire.

Concernant les 5 patients traités par IP infectés par des virus ayant des MR-IP majeurs en rapport avec leur traitement à l'EV, aucune de ces MR n'étaient détectées à taux minoritaire avant traitement. La plupart des MR-IP accessoires étaient déjà présentes à taux majoritaire avant traitement, détectées par SS et UDS.

Tableau 3 : Liste des mutations de résistance (MR) détectées avant traitement (T0) et à l'échec virologique (EV) par séquençage Sanger (SS) et Ultra-Deep Sequencing (UDS) pour les patients en EV sous un traitement antirétroviral (ARV) comportant un IP (N=15)

Pt.	CV à T0 (cp/ml)	MR à T0 SS et UDS (%)			GSS à T0		ARV	CV à EV (cp/ml)	MR à l'EV SS et UDS (%)			GSS à l'EV	
		Protease	NRTI	NNRTI	SS	UDS			Protease	NRTI	NNRTI	SS	UDS
4	125416	<u>L10I</u> , <u>M36I</u> , <u>D60E</u> , <u>L63P</u> , <u>A71T</u> , G48V	<u>M41L</u> , <u>D67N</u> , <u>L210W</u> , <u>T215Y</u>	V179T, E138G (2.1)	2	2	ZDV 3TC DDI NFV	5914	<u>L10I</u> , <u>M36I</u> , <u>D60E</u> , <u>L63P</u> , <u>A71T</u> , G48V , V82A	<u>M41L</u> , <u>D67N</u> , <u>L210W</u> , <u>T215Y</u> , <u>M184V</u>	V179T	0.5	0.5
14	1292950	<u>M36I</u> , <u>I62V</u> , <u>L63P</u> , <u>A71T</u> , <u>V77I</u>	0	0	2.5	2.5	ZDV 3TC ABC NFV	8435	<u>M36I</u> , <u>I62V</u> , <u>L63P</u> , <u>A71T</u> , <u>V77I</u>	<u>M184I</u> (4.3)	Y188C (2.0)	2.5	2
16	20103	<u>V77I</u> , <u>L63P</u> (1.5)	0	0	2.5	2.5	ZDV 3TC ABC LPV/r	1170	V77I	0	0	2.5	2.5
23	121221	<u>M36I</u> (13.1), <u>A71T</u> (11.2)	0	0	2	2	ZDV 3TC NFV	2414	<u>M36I</u> (15.4)	0	0	2	2
25	119112	G16E, <u>I62V</u> , <u>L63P</u> , <u>V77I</u>	<u>L210W</u> , <u>T215D</u> , <u>M41L</u> (4.0)	0	2	2	3TC TDF LPV/r	97597	G16E, <u>I62V</u> , <u>L63P</u> , <u>V77I</u> , <u>D60E</u> (1.5)	<u>L210W</u> , <u>T215D</u> , <u>M41L</u>	0	2	2
31	198233	<u>L10V</u> , G16E, K20I, <u>M36I</u> , H69K, L89M	0	0	2	2	ZDV 3TC LPV/r	59663	<u>L10V</u> , G16E, K20I, <u>M36I</u> , H69K, L89M	0	0	2	2
40	96878	<u>K20R</u> , <u>M36I</u> , <u>I62V</u> , <u>L63P</u> , <u>M36L</u> (2.1)	0	0	2	2	ZDV 3TC LPV/r	2021	<u>K20R</u> , <u>M36I</u> , <u>I62V</u> , <u>L63P</u> , M46L , I54V , V82A , <u>L10V</u> (5.0)	<u>M184V</u>	0	1.5	0.5
41	771	<u>K20I</u> , <u>M36I</u> , H69K, L89M	0	0	2	2	3TC TDF ATZ/r	1530	K20I, <u>M36I</u> , H69K, L89M	0	0	2	2

43	83525	K20I, <u>M36I</u> , H69K, L89M	0	0	2	2	ZDV 3TC NFV	9819	K20I, <u>M36I</u> , H69K, L89M, D60E, L63P, I54V , L90M , <u>L89I</u> (26.3), M46L (5.0)	<u>M184V</u>	0	0.5	0.5
46	140551	<i>M36I</i> (1.0)	0	0	2.5	2.5	ZDV 3TC ABC LPV/r	14505	M36I, <i>V11I</i> (1.5)	<u>L74V</u> (3.0)	0	2.5	2
49	232736	K20R, <i>V77I</i> , <i>M36I</i> (32.6), <i>L63P</i> (3.4)	0	V90I	2	2	3TC ABC FPV/r	2387	<i>V77I</i>	<u>M184I</u> (2.7)	V90I	2	1.5
51	19200	G16E, <u>K20R</u> , <u>M36I</u> , <u>I62V</u> (8.5), <i>V77I</i> (4.6)	0	0	2	2	TDF FTC LPV/r	12796	G16E, <u>K20R</u> , <u>M36I</u> , <i>V77I</i> (1.9)	<u>M184V</u> , <u>M184I</u> (2.2)	<i>K101E</i> (6.8)	1.5	1.5
52	782200	I62V, L63P, <i>V77I</i> , <u>M36I</u> (1.3)	0	<i>V90I</i> (4.5)	2	2	TDF FTC ATZ/r	2155	I62V, L63P, <i>V77I</i> , N88S , M46L (18.8), M46I (8.3), <u>A71V</u> (9.2), <u>G73S</u> (24.1)	<u>M184V</u>	0	0.5	0.5
57	142700	<u>M36I</u> , I62V, <u>L63P</u> , <u>A71T</u> , <i>V77I</i>	0	0	2	2	ZDV 3TC LPV/r	4861	M36I, I62V, <u>L63P</u> , <u>A71T</u> , <i>V77I</i> , <i>G16E</i> (1.6)	<u>M184V</u>	0	1.5	1.5
79	1108000	<u>M36I</u> , L63P, <i>G16E</i> (19.3), <i>K20T</i> (5.1), <i>I62V</i> (5.8), <i>V77I</i> (4.4)	<u>T215D</u>	V90I	2	2	DDI D4T NFV	1693	M36I, L63P, D30N	<u>D67N</u> , <u>T215D</u> , <u>M184V</u>	V90I	0.5	0.5

Normal: MR détectées par SS et UDS / *Italique* : MR détectées que par UDS/ **Gras** : Mutations majeurs aux IP/ Souligné : MR associées au traitement prescrit

IP: inhibiteur de protéase; GSS (Genotypic Sensitivity Score): score de sensibilité au traitement prescrit; ZDV: zidovudine; DDI: didanosine; D4T: stavudine; 3TC: lamivudine; FTC: Emtricitabine; ABC: abacavir; TDF: tenofovir; NFV: nelfinavir; LPV/r: lopinavir; ATZ: atazanavir, FPV: fosamprenavir

Tableau 4 : Liste des mutations de résistance (MR) détectées avant traitement (T0) et à l'échec virologique (EV) par séquençage Sanger (SS) et Ultra-Deep Sequencing (UDS) pour les patients en EV sous un traitement antirétroviral (ARV) comportant un INNTI (N=6) ou uniquement des INTI (N=8)

Pt.	BL VL (cp/ml)	Baseline DRM SS and UDS (%)			BL GSS		ART	VF VL (cp/ml)	VF DRM SS and UDS (%)			VF GSS	
		Protease	NRTI	NNRTI	SS	UDS			Protease	NRTI	NNRTI	SS	UDS
20	45028	L63P, L33V (6.4), M36I (24.8)	0	0	2	2	ZDV 3TC NVP	6572	L63P, M36I (6.9)	M184V	K103N, H221Y, M230L, V90I (14.5)	0.5	0.5
28	49268	0	0	0	1.5	1.5	ZDV 3TC ABC	88025	G16E (2.7), L33V (2.6), M36I (1.8), V77I (2.0)	0	0	1.5	1.5
38	38779	M36I	0	0	1.5	1.5	ZDV 3TC ABC	9132	0	M184V	0	1	1
47	1324	K20I, M36I, H69K, L89M	0	0	2	2	3TC FTC EFV	2160	K20I, M36I, H69K, L89M	0	0	2	2
61	33676	K20I, M36I, H69K, L89M, G16E (1.1)	0	Y181C (2.1)	2	1	3TC D4T NVP	533	K20I, M36I, H69K, L89M, H69R (4.4), D30N (1.3)	M184I	Y181C, V90I	0.5	0.5
62	67288	L63P, D60E (8.5), I62V (3.0), V77I (12.0)	0	V90I	2	2	ZDV 3TC NVP	10371	I62V, L33V (2.9), L63P (35.3)	0	Y181C, V90I, K101E (4.2)	1	1
63	88509	G16E, M36I, I62V, H69K, K20R (11.6)	ND	ND	ND	ND	ZDV 3TC ABC	676	G16E, M36I, I62V, H69K K20R	M184V*	0*	1	ND

64	141586	V11I, K20I, M36I, H69K, L89M, V77I (6.7)	0	0	2	2	3TC TDF EFV	41115	V11I, K20I, M36I, H69K, L89M	<u>M184V</u> (3.8)	<u>G190S</u> , V90I (45.0)	1	0.5
76	15857	I62V, M36I (2.7), Q58E (2.5), L63P (2.3)	0	V106I (11.0), V90I (1.9)	1	1	ZDV 3TC	2438	I62V	<u>M184V</u> , <u>K70R</u> (15.2)	0	0.5	0.5
80	1607	D60E, L63P	<u>D67N</u> , <u>K70R</u> , <u>T215Y</u> , <u>K219E</u> , <u>M41L</u> (2.6)	0	0	0	DDI D4T	2033	D60E, L63P	<u>D67N</u> , <u>K70R</u> , <u>T215Y</u> , <u>K219E</u> , <u>M41L</u>	0	0	0
82	586670	L63P, V77I	<u>L210W</u> (9.0)	K103N	1.5	1.5	ZDV 3TC ABC	2667	L63P, V77I, D60E (2.8)	<u>M184V</u>	K103N	1	1
83	6741	L63P, K20R (4.0), M36I (7.5)	0	V90I (6.6)	1	1	ZDV 3TC	1812	L63P	<u>M184V</u>	0	0.5	0.5
85	147650	0	0	V90I (2.2)	2	2	3TC TDF EFV	3306	0	0	V90I	2	2
86	57839	V77I	0	E138G (1.1)	1.5	1.5	ZDV 3TC ABC	6540	0	<u>M184V</u> , <u>Y115F</u> (34.9)	V90I, H221Y (8.6)	1	0.5

* Echec de l'UDS, seules les MR détectées par SS sont listées, ND: non déterminé (échec de l'UDS et SS)

Normal: MR détectées par SS et UDS / *Italique* : MR détectées que par UDS/ **Gras** : Mutations majeurs aux IP/ Souligné : MR associées au traitement prescrit

INTI: inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse; INNTI: inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse; GSS (Genotypic Sensitivity Score): score de sensibilité au traitement prescrit; ZDV: zidovudine; DDI: didanosine; D4T: stavudine; 3TC: lamivudine; FTC: Emtricitabine; ABC: abacavir; TDF: tenofovir; NFV: nelfinavir; LPV/r: lopinavir; ATZ: atazanavir, FPV: fosamprenavir

E. DISCUSSION

Notre étude apporte de nouvelles données sur la prévalence des MRM aux IP, INTI et INNTI avant traitement et à l'EV, ainsi que sur l'évolution de ces MRM sous traitement ARV. Plus de 2/3 des patients avaient des MRM additionnelles détectées uniquement par UDS, avec 1.4 fois plus de MR détectées par UDS avant traitement et 1.3 fois plus à l'EV par rapport à la technique de séquençage classique selon la méthode de Sanger. Ces données concordent avec celles précédemment rapportées dans la littérature sur la prévalence non négligeable des MRM détectées par UDS aussi bien chez les patients naïfs [14-18,40] que chez les patients prétraités [19-24,41], confirmant la haute sensibilité de cette technique pour détecter et quantifier ces MRM.

Ces MRM détectées uniquement par UDS augmentaient la résistance génotypique potentielle globale à au moins un ARV chez 13.8% des patients à T0 et 31% des patients à l'EV. Néanmoins, elles n'augmentaient la résistance génotypique théorique du virus au traitement ARV finalement prescrit au patient que dans 3.5% des patients à T0 et 20.7% des patients à l'EV.

Parmi nos 29 patients, 26 avaient du FTC ou du 3TC dans leur régime thérapeutique. La mutation M184V/I a été détectée chez 17 d'entre eux à l'EV (et uniquement par UDS à taux minoritaire chez 3 d'entre eux). Néanmoins, nous n'avons détecté cette mutation avant traitement pour aucun patient, même à taux minoritaire. Contrairement à notre étude, plusieurs auteurs rapportent la détection de virus porteur de la mutation M184V à taux minoritaire chez des patients naïfs de traitement, en primo-infection [54,55] ou infectés de façon chronique [48]. Cette différence pourrait en partie s'expliquer par le type de technique de séquençage ultrasensible utilisée. Dans ces études, la mutation M184V était détectée par PCR spécifique d'allèle, permettant la détection de MR à un taux inférieur à notre seuil de 1%. Dans son étude,

Simen *et al.* rapportent une très faible prévalence de virus porteurs de la M184V à taux minoritaire détectés par UDS chez des patients infectés par le VIH et naïfs de traitement ARV [18]. Cette absence de M184V chez nos patients avant traitement peut également résulter de l'impact négatif majeur de la M184V sur la capacité répliquative du virus [19,56,57]. Une longue période de temps entre la séroconversion (et donc la transmission potentielle de variants viraux porteurs de la M184V) et le prélèvement de notre échantillon de sang pour notre analyse à T0 pourrait ainsi conduire, en l'absence de pression de sélection médicamenteuse, à l'élimination progressive de ces variants à capacité répliquative diminuée jusqu'à un très faible niveau (en dessous des limites de détection de l'UDS) voire à leur élimination totale du plasma.

Une des principales questions soulevées par ces nouvelles techniques ultrasensibles est celle de la signification et de la pertinence clinique de ces MRM, notamment leur rôle dans la survenue d'un EV.

Dans notre étude, 4/29 patients étaient infectés par un virus porteur de MRM-INTI ou de MRM-INNTI en rapport avec leur futur traitement ARV, et ces MRM étaient retrouvées à taux majoritaire à l'EV chez 3 d'entre eux (la MRM-INTI détectée chez le 4^{ème} patient non retrouvée à l'EV étant une MR de type TAM présente de façon isolée à T0). De plus, pour l'unique patient infecté par un virus porteur d'une MRM-INNTI à T0 (Y181C à 2.1%) pouvant conduire à une résistance à son futur traitement par INNTI, cette MRM était retrouvée à taux majoritaire à l'EV par SS et par UDS.

L'impact des MRM sur l'efficacité des ARV dépend probablement du pourcentage de variants viraux porteurs de MR et de la CV mutée (c'est-à-dire la charge virale en virus muté correspondant au pourcentage de virus présentant une MR multiplié par charge virale du patient) [14,44,46].

Une méta-analyse de 2011 a mis en évidence un risque plus élevé d'EV sous un traitement de première ligne comportant un INNTI en cas de MRM-INNTI même à très faible taux (HR: 2.2 [IC95%: 1.5-3.2] en cas de CV mutée comprise entre 10 et 99 copies/ml), mais a également retrouvé un effet taux-dépendant des MRM avec un risque significativement plus élevé en cas de MRM présentes à un taux >1% (HR: 5.0, IC95%: 2.4-10.3) ou de CV mutée supérieure à 1000 copies/ml (HR: 4.1, IC95%: 2.5-6.8) [46]. Goodman *et al.* rapportent une forte association entre la survenue d'un EV et la présence de la MR K103N à taux minoritaire uniquement si le taux de K103N était supérieure à 2% ou si la CV mutée était supérieure à 2000 copies/ml [44]. Dans leur étude, Cozzi-Lepri *et al.* ne retrouvaient une association significative entre la présence de MRM sur la RT et la survenue d'un EV qu'en cas de CV mutée > 1000 copies/ml [14]. Dans notre étude, nous avons choisi de ne rapporter que les MRM présentes à un taux > 1% (quelle que soit la CV mutée), pour sélectionner les MR ayant un impact potentiellement plus fort sur la réponse virologique, mais également pour exclure les MR liées à un artefact des techniques virologiques lors de l'amplification par PCR et/ou du séquençage [51]. Si la CV mutée semble finalement avoir un impact plus important que le pourcentage de virus muté, cette notion n'était pas clairement établie à l'époque où nous avons réalisé cette étude, et nous avons choisi de ne rapporter que le pourcentage de virus muté afin de ne pas rendre plus complexe la lecture de nos résultats.

L'impact des MRM sur l'efficacité des ARV dépend également du type de régime thérapeutique et de la barrière génétique des ARV.

Un nombre croissant d'études rapportent une forte association entre la présence de MRM-INNTI avant traitement et la survenue d'un EV chez les patients traités par des régimes thérapeutiques comportant des INNTI de 1^{ère} génération [14,18,25,39,42-44,46,58], y compris pour les patients ayant une très bonne observance médicamenteuse [42,58]. Dans notre étude,

seul un patient avait un virus porteur d'une MRM à T0 pouvant entraîner une résistance à son traitement, il s'agissait d'un traitement comportant un INNTI et la MR était retrouvée à l'EV à taux majoritaire. Dans une méta-analyse publiée en 2011 regroupant 10 études soit 985 participants, Li *et al.* rapportent un risque plus de 2 fois plus élevé d'EV sous un traitement de première ligne comportant un INNTI de 1^{ère} génération en cas de MRM aux INNTI préexistantes (HR : 2.6, IC95% 1.9-3.5), et l'utilisation de tests génotypiques ultra-sensibles avant traitement par INNTI permettrait d'éviter 1 échec virologique pour 11 patients testés [46]. Dans une étude multicentrique européenne portant sur 260 patients débutant un traitement de 1^{ère} ligne comportant un INNTI, Cozzi-Lepri *et al.* rapportent que la mise en évidence de MRM-INNTI avant traitement était associée à un risque plus de 2 fois plus élevé d'EV (HR : 2.41, IC95% 1.12-5.18) [14]. L'association entre la présence de MRM-INNTI et un risque plus élevé d'EV sous régime ARV comportant des INNTI a également été rapportée chez des patients prétraités par INNTI [59,60].

Quelques études rapportent également une plus forte prévalence de MR aux INNTI de 2^{ème} génération (Rilpivirine et Etravirine) détectées par UDS, chez les patients naïfs [16] ou prétraités [20,21], mais leur impact sur la réponse virologique reste encore à déterminer. Charpentier *et al.* rapportent une prévalence plus élevée de MR à l'Etravirine détectées par UDS que par SS (29% des patients versus 17% des patients respectivement) chez des patients hautement prétraités participant à l'essai TRIO ANRS 139. Les MRM mises en évidence (CV mutée médiane à 560 copies/ml) n'étaient pas prédictives de la survenue d'un EV ultérieur, bien que la prévalence des MR à l'Etravirine détectées par UDS avait tendance à être plus élevée chez les patients en EV que chez les patients en succès virologique (6/12 patients soit 50% versus 18/70 patients soit 26% respectivement, $p=0.09$) [41].

Les rares études portant sur la prévalence des MRM aux inhibiteurs de l'intégrase (INI) concernent essentiellement des patients hautement prétraités initiant un traitement de sauvetage comportant du Raltégravir. Ces études rapportent actuellement une faible prévalence de MR au Raltégravir, y compris des MRM > 1% par méthodes génotypiques ultrasensibles [61-63]. Charpentier *et al.* rapportent une plus forte prévalence de MR au Raltégravir détectées par UDS que par SS (9% des patients par UDS soit 8 patients, versus 2% par SS) chez des patients hautement prétraités. Les MRM mises en évidence (CV mutée médiane de 128 copies/ml) n'étaient pas prédictives de la survenue d'un échec virologique ultérieur [41]. Dans une étude portant sur des patients en succès thérapeutique débutant un traitement par Maraviroc + Raltégravir (essai ARNS 157 ROCnRAL), la présence de MRM au Raltégravir (retrouvées chez 3 patients) n'était pas associée à un risque plus élevé d'EV ultérieur [64]. Le faible nombre d'études actuellement publiées ne permet toutefois pas de conclure sur un éventuel impact des MRM aux INI sur la réponse virologique sous un traitement ARV comportant cette classe thérapeutique.

Plusieurs études rapportent que la mise en évidence d'une population virale à tropisme CXCR4 à taux minoritaire, par l'utilisation de techniques ultrasensibles telles que l'UDS, était associée à un risque plus élevé d'EV sous inhibiteur de CCR5 [65-69].

L'association entre la présence de MRM-INI et la survenue d'un EV ultérieur reste encore très controversée. Dans leur méta-analyse de 2011, Li *et al.* rapportent que la mise en évidence de MRM-INI (M184V et K65R) n'était pas associée à un risque significativement plus élevé d'EV sous un traitement de 1^{ère} ligne avec un INNTI (HR : 1.6, IC 95% : 0.1-17.7) mais cette analyse avait été réalisée sur un nombre très limité de patients (9 patients), d'où un manque très probable de puissance statistique [46]. Dans leur étude multicentrique, Cozzi-Lepri *et al.* rapportent un risque plus élevé d'EV en cas de MRM-INI chez des patients débutant un

traitement par 2 INTI et 1 INNTI (OR : 2.27, IC95% 0.76–6.77), cette association n'étant là encore pas significative avec un effectif faible de patients (8 patients avec au moins une MRM-INTI avant traitement) [14]. Dans leur étude portant sur 146 patients, Metzner *et al.* ne rapportent pas d'association entre la détection par AS-PCR de MRM-INTI (M184V et K65R) et la survenue d'un EV, la plupart des patients présentant des MRM-INTI débutant un premier traitement comportant un IP/r [48]. Une autre étude portant sur 109 patients naïfs débutant un traitement comportant un IP/r ne retrouve également pas d'association entre la présence de la MR M184V détectées par AS-PCR (taux $\geq 0.4\%$) et la survenue d'un EV [47]. Lataillade *et al.* rapportent par contre un taux plus élevé d'EV chez des patients débutant un traitement comportant 2 INTI et un IP/r ayant certaines MRM-INTI détectées par UDS avant traitement (M184V et/ou multiples TAM avec un seuil $> 1\%$), avec toutefois un effectif faible de patients [15].

Les rares études ayant étudié l'impact des MRM-IP chez des patients sous régime thérapeutique comportant des IP/r n'ont pas retrouvé d'association entre la présence de ces MRM-IP et un risque plus élevé d'EV [15,18].

Dans notre étude, les MRM-IP détectées par UDS avant traitement étaient principalement des MR accessoires. Aucune des MR-IP majeures retrouvés à l'EV n'étaient détectées à taux minoritaire avant traitement. Des MR-IP majeures présentes à taux minoritaire ont été détectées par UDS à l'EV chez 2/15 patients sous régime thérapeutique comportant un IP/r, mais ne conduisaient pas à un changement de la sensibilité génotypique du virus à l'IP prescrit. Les MRM-IP accessoires détectées par UDS à l'EV conduisaient à un changement de la sensibilité génotypique du virus à l'IP prescrit chez un de ces 15 patients, ce qui pourrait expliquer l'EV. D'autres études rapportent dans la littérature que des MRM-IP majeures sont rarement détectées par UDS (la plupart des MRM-IP détectées étant des MR accessoires), et surviennent de manière isolée, chez les patients naïfs [15] et chez les patients en EV sous IP/r [22,23,70]. Une

étude a par ailleurs mis en évidence que les virus porteurs de MRM-IP majeures (MR à l'Atazanavir et au Lopinavir) gardaient une sensibilité phénotypique à ces IP [22]. Ceci pourrait être en partie expliqué par le fait que ces MRM étaient retrouvées à un taux très faible (< 0.5-1%). Charpentier *et al.* rapportent une plus forte prévalence de MR au Darunavir détectées par UDS que par SS (40% des patients soit 32 patients versus 23% soit 28 patients respectivement) chez des patients hautement prétraités, les MRM mises en évidence (CV mutée médiane à 713 copies/ml) n'étant pas prédictives de la survenue d'un échec virologique ultérieur [41].

La très faible prévalence des MRM-IP majeures à des taux significatifs (>1%) combinée à la haute barrière génétique à la résistance des IP (avec nécessité de multiples MR pour entraîner une résistance à un IP [71]) pourraient expliquer l'absence d'association retrouvée entre la présence de ces MRM-IP et un risque plus élevé d'EV chez les patients sous régime thérapeutique comportant des IP/r. D'autres études sont nécessaires pour déterminer si la présence de multiples MRM-IP majeures peut affecter l'efficacité virologique des IP/r.

Notre travail comportait plusieurs points faibles :

- Premièrement, les patients étaient inclus dans notre étude s'ils présentaient un EV sous une première ligne de traitement ARV. Tous les patients étaient donc en EV et la prévalence des MRM détectées avant traitement dans notre groupe de patients n'a pas été comparée à celle des MRM détectées avant traitement chez des patients en succès virologique sous un traitement ARV de première ligne. Par conséquent, nous n'avons pas pu étudier l'impact des MRM sur la réponse virologique mais uniquement décrire leur prévalence et leur évolution sous traitement
- Secondairement, en raison du faible nombre de patients présentant un EV sous un traitement ARV de première ligne ayant des échantillons de plasma disponibles et à T0 et à l'EV, seulement 29 patients ont pu être inclus dans notre étude. De plus, près de 60% d'entre eux

ont débuté un traitement avant 2003, avec par conséquent un régime thérapeutique n'étant plus d'actualité, avec notamment 27.5% des patients sous bithérapie ou trithérapie d'INTI, et 17.2% sous régime comportant un IP non boosté. Notre faible effectif de patients ne nous a malheureusement pas permis de réaliser des comparaisons en fonction de la date d'initiation du traitement ARV (avant ou après 2003) ou en fonction du type de régime thérapeutique.

- Enfin, nous n'avons aucune donnée sur l'observance thérapeutique de nos patients. Pour 8 patients, aucune résistance du virus au traitement n'a été mise en évidence à l'EV, ce qui suggère que leur EV était probablement lié à une mauvaise observance médicamenteuse. Les niveaux de CV élevés observés à l'EV pour certains patients suggèrent également une inobservance du traitement. De plus, la plupart des MR retrouvées à l'EV n'étaient pas détectées avant traitement même à taux minoritaire, et ont donc été sélectionnées sous traitement ARV, leur sélection étant probablement favorisée par une mauvaise observance. L'observance au traitement est un facteur prédictif majeur d'échec virologique et de progression de la maladie [72]. La présence de MRM est rapportée comme associée à un risque plus élevé d'EV notamment en cas d'observance optimale au traitement ARV [42,58]. L'impact des MRM sur la réponse virologique est en effet très faible en comparaison à l'inobservance et la recherche de ces MRM n'a probablement que peu d'intérêt chez les patients ne prenant pas leur traitement. Ce paramètre essentiel doit donc être pris en compte dans les études étudiant l'impact de ces MRM.

F. CONCLUSION

La réalisation d'un test génotypique de résistance par UDS a permis d'identifier significativement plus de MR comparativement au SS, aussi bien chez le patient naïf que chez le patient en EV sous traitement ARV, et ce pour toutes les classes thérapeutiques (INTI, INNTI et IP/r). Pour quelques patients, ces MRM conduisaient à un changement de la sensibilité génotypique au traitement ARV (4% des patients avant traitement et 21% des patients à l'EV).

Notre travail de thèse nous a permis d'améliorer la technique d'UDS afin qu'elle puisse être utilisable en routine et de confirmer sa plus grande sensibilité par rapport au SS. Néanmoins elle ne permettait pas d'étudier l'impact de ces MRM détectées sur la réponse virologique et donc d'établir des recommandations sur ses indications.

D'après les données de la littérature, la mise en évidence de MRM-INNTI semble maintenant clairement associée à un risque plus élevé d'EV en cas de traitement ARV comportant un INNTI de première génération. Le risque d'EV sous inhibiteur de CCR5 semble également plus élevé en cas de détection préalable de virus minoritaires à tropisme CXCR4. D'après les données de la littérature, l'impact des MRM sur la réponse virologique reste incertain pour les MRM aux INTI, aux INNTI de seconde génération, aux IP et aux INI. Cet impact dépend très probablement d'une part de la proportion des MRM (ou de la CV mutée) et du type de chaque MRM, et d'autre part du type de régime thérapeutique et de la barrière génétique des ARV composant ce traitement.

De larges études prospectives complémentaires sont donc nécessaires aussi bien chez le patient naïf avant d'introduire un traitement que chez le patient en échec virologique sous traitement ARV (avec des régimes thérapeutiques correspondant aux recommandations actuelles) avant

de pouvoir donner des recommandations sur l'utilisation des techniques de séquençage à haut-débit en pratique clinique, dont les indications restent difficiles à définir.

Une étude française multicentrique coordonnée par Stéphanie Raymond (Laboratoire de Virologie de Toulouse, INSERM U1043) est actuellement en cours (étude RILPYRO), dont l'objectif est d'étudier l'impact des variants minoritaires résistants (détectés par séquençage haut-débit de la transcriptase inverse) chez 500 patients recevant un premier traitement antirétroviral comportant de la rilpivirine.

Cette étude a été publiée dans la revue Plos One en janvier 2014.

Prevalence and Evolution of Low-Frequency HIV-1 Drug Resistance Mutations Detected by Ultra-Deep Sequencing in HIV-1 Infected Patients Experiencing First-Line Antiretroviral Therapy Failure. PLoS One. 2014 Jan 27;9(1):e86771.

M-A. Vandenhende, P. Bellecave, P. Recordon-Pinson, S. Reigadas, Y. Bidet, M. Bruyand, F. Bonnet, E. Lazaro, D. Neau, H. Fleury, F. Dabis, P. Morlat, B. Masquelier.

Prevalence and Evolution of Low Frequency HIV Drug Resistance Mutations Detected by Ultra Deep Sequencing in Patients Experiencing First Line Antiretroviral Therapy Failure

Marie-Anne Vandenhende^{1,2,4,6,7,9}, Pantxika Bellecave^{1,2,3,9}, Patricia Recordon-Pinson^{1,2,3}, Sandrine Reigadas^{1,2,3}, Yannick Bidet⁵, Mathias Bruyand^{7,8}, Fabrice Bonnet^{4,6,7}, Estibaliz Lazaro⁹, Didier Neau¹⁰, Hervé Fleury^{1,2,3}, François Dabis^{6,7,8}, Philippe Morlat^{4,6,7}, Bernard Masquelier^{1,2,3†}

1 Université Bordeaux, Microbiologie fondamentale et Pathogénicité, UMR 5234, Bordeaux, France, **2** Centre national de la recherche scientifique, Microbiologie fondamentale et Pathogénicité, UMR 5234, Bordeaux, France, **3** Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Laboratoire de virologie, Bordeaux, France, **4** Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Service de Médecine Interne et Maladies Infectieuses, Hôpital Saint-André, Bordeaux, France, **5** Centre Jean Perrin, Plateforme GINA, EA 4677 ERTICA, Clermont-Ferrand, France, **6** Université Bordeaux, ISPED, Centre Inserm U897- Epidémiologie-Biostatistique, Bordeaux, France, **7** Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, COREVIH Aquitaine, Bordeaux, France, **8** Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, ISPED, Centre Inserm U897- Epidémiologie-Biostatistique, Bordeaux, France, **9** Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Service de Médecine Interne et Maladies Infectieuses, Hôpital Haut-Lévêque, Bordeaux, France, **10** Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Fédération de maladies infectieuses et tropicales, Hôpital Pellegrin, Bordeaux, France

Abstract

Objectives: Clinical relevance of low-frequency HIV-1 variants carrying drug resistance associated mutations (DRMs) is still unclear. We aimed to study the prevalence of low-frequency DRMs, detected by Ultra-Deep Sequencing (UDS) before antiretroviral therapy (ART) and at virological failure (VF), in HIV-1 infected patients experiencing VF on first-line ART.

Methods: Twenty-nine ART-naïve patients followed up in the ANRS-CO3 Aquitaine Cohort, having initiated ART between 2000 and 2009 and experiencing VF (2 plasma viral loads (VL) >500 copies/ml or one VL >1000 copies/ml) were included. Reverse transcriptase and protease DRMs were identified using Sanger sequencing (SS) and UDS at baseline (before ART initiation) and VF.

Results: Additional low-frequency variants with PI-, NNRTI- and NRTI-DRMs were found by UDS at baseline and VF, significantly increasing the number of detected DRMs by 1.35 fold ($p < 0.0001$) compared to SS. These low-frequency DRMs modified ARV susceptibility predictions to the prescribed treatment for 1 patient at baseline, in whom low-frequency DRM was found at high frequency at VF, and 6 patients at VF. DRMs found at VF were rarely detected as low-frequency DRMs prior to treatment. The rare low-frequency NNRTI- and NRTI-DRMs detected at baseline that correlated with the prescribed treatment were most often found at high-frequency at VF.

Conclusion: Low frequency DRMs detected before ART initiation and at VF in patients experiencing VF on first-line ART can increase the overall burden of resistance to PI, NRTI and NNRTI.

Citation: Vandenhende M-A, Bellecave P, Recordon-Pinson P, Reigadas S, Bidet Y, et al. (2014) Prevalence and Evolution of Low Frequency HIV Drug Resistance Mutations Detected by Ultra Deep Sequencing in Patients Experiencing First Line Antiretroviral Therapy Failure. PLoS ONE 9(1): e86771. doi:10.1371/journal.pone.0086771

Editor: Luis Menéndez-Arias, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Spain

Received: October 7, 2013; **Accepted:** December 17, 2013; **Published:** January 27, 2014

Copyright: © 2014 Vandenhende et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013) under the project Collaborative HIV and Anti-HIV Drug Resistance Network (CHAIN) (grant no. 223131), the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les Hépatites and the University Bordeaux Segalen - Centre national de la recherche scientifique UMR 5234. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: pantxika_bellecave@yahoo.fr

† These authors contributed equally to this work.

† Deceased.

Introduction

The advent of combination antiretroviral therapy (ART) has dramatically reduced HIV-1 infection-related morbidity and mortality [1]. However, the efficiency of these treatments can be compromised by the presence of drug-resistant variants, resulting in

virological failure [2]. According to epidemiological studies, 8–11% of antiretroviral naïve patients are infected with a virus harbouring drug resistance associated mutations (DRMs) in Europe and the USA [3]. Treatment guidelines therefore recommend genotypic

resistance testing before initiating antiretroviral therapy and in the case of virological failure [4].

Standard genotyping by Sanger sequencing (SS) used currently in clinical practice cannot detect viral variants representing less than 15–25% of the viral population [5]. More sensitive techniques have been developed, including ultra-deep sequencing (UDS), which can detect and quantify low-frequency variants harbouring DRMs down to 0.5–1% [6].

Clinical relevance of detecting low-frequency DRMs remains open to debate. Some studies have found no significant association between the presence of low-frequency DRMs and subsequent virological failure [7–9] while others reported an overt correlation [10–14]. A recent pooled analysis showed that low-frequency non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI)-DRMs increased the risk of virological failure (VF) with NNRTI-based regimen more than two-fold [15]. The impact of low-frequency protease inhibitor (PI)-DRMs on treatment response has been limited to a few studies that found no associations [11,16].

The objectives of our study were to determine the prevalence of DRMs detected by UDS as well as their effect on ART resistance before treatment and at VF, and to analyse their evolution under treatment, in HIV-1 infected patients experiencing VF on first-line ART.

Methods

Ethics statement

All patients included in this study gave written informed consent. The study protocol was approved by the Ethics committee of Bordeaux University Hospital (Comité de protection des personnes).

The Agence Nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS) CO3 Aquitaine Cohort is a prospective hospital-based cohort of HIV-1 infected patients under routine clinical management, initiated in 1987 in the Bordeaux University Hospital and four other public hospitals in the Aquitaine region, South Western France. Inclusion criteria are: adult patients of the participating hospital wards with confirmed HIV-1 infection, having at least one follow-up after the first report, and having given informed consent. Visits occur usually every three months if the patient is treated, every six months otherwise. Detailed presentation of the cohort has been reported elsewhere [17].

Study population

Patients starting a first antiretroviral treatment between January 2000 and June 2009 were retrospectively screened from the ANRS CO3 Aquitaine Cohort database.

Patients experiencing virological failure (VF), defined as a plasma viral load (VL) >1,000 copies/ml or 2 consecutives VL>500 cp/ml at least 6 months after ART initiation, and with plasma samples available both at baseline (last sample available before ART initiation) and at VF (plasma sample corresponding to first VL>1000 or second VL>500 cp/ml) were included in our study. Patients were excluded if they changed or stopped their ART. Socio-demographic, clinical and biological characteristics of eligible participants were extracted from the database.

Sanger sequencing

Viral RNA was extracted from 1 ml of plasma sample at baseline and at VF using the High Pure Viral RNA kit (Roche). The Reverse Transcriptase (RT) and Protease gene sequences were determined using Sanger sequencing (SS) according to the ANRS consensus method (<http://www.hivfrenchresistance.org>).

Ultra-deep sequencing (UDS)

Viral RNA was extracted as described above and used as a template for RT-PCR. The *Pol* region (HxB2 position: 2082–3420) was amplified using the 5P1 and MJ4 primers and the SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). RT-PCR conditions were reverse-transcription at 50°C for 30 minutes, one denaturation step of 94°C for 2 minutes, followed by 40 cycles of denaturation for 30 seconds at 94°C, annealing for 30 seconds at 55°C, extension for 90 seconds at 68°C, and a final 7-minutes extension at 68°C.

Two microliters of RT-PCR product were used to generate 4 amplicons (Prot, RT1, RT2 and RT3) encompassing protease and RT regions and harbouring specific MID in their end. Amplicons and primers are described in **Table 1**. The nested PCR was performed with the FastStart High Fidelity PCR System (Roche Diagnosis) and according to the following conditions: initial denaturation step of 94°C for 3 minutes followed by 40 cycles of denaturation for 30 seconds at 94°C, annealing for 45 seconds at 55°C, and extension for 60 seconds and a final 8-minutes extension at 72°C.

PCR products were purified using magnetic beads (Agencourt AMPure Kit, Beckman Coulter, and Benried, Germany) to eliminate primer-dimers. The number of molecules was quantified by fluorometry (Quant-iT PicoGreen dsDNA assay kit, Invitrogen, Carlsbad, CA) and equimolar concentrations of amplicons were pooled. This library was submitted to emulsion-based clonal amplification (emPCR) using GS Junior Titanium emPCR Kit (Lib-A) according to Roche's protocol. UDS was performed in both strands on a 454 Life Science Roche GS junior. Amplicon Variant Analyzer (AVA 2.7) software (454 Life Sciences; Roche) was used to align all read amplicons and to calculate variant frequencies at each nucleotide position relative to the HxB2 reference HIV-1 strain sequence. Raw data were submitted to GenBank under SRP033482 study accession number.

UDS technical error rate

To estimate the error rate of our UDS protocol, we calculated the percentage of errors generated from 2 steps of PCR (Platinum Taq Polymerase followed by FastStart High Fidelity polymerase amplification) and pyrosequencing of a plasmid control containing

Table 1. Primers used for amplicon generation.

Amplicon	HxB2 position	HIV specific primer (5'-3')
Prot	2136–2164	TCAGAGCAGACCAGAGCCAAACAGCCCCA
	2621–2650	AATGCTTTTATTTTCTTCTGTGCAATGGC
RT1 ¹	-	-
	-	-
RT2	2706–2734	GAAATCCATACAATACTCCAGTATTTGC
	3119–3145	CTATGCTGCCCTATTTCTAAGTCAGAT
RT3 ²	2874–2891	CTRGATGTGGGTGATGCA
	3265–3284	CNYTATAGGCTGTACTGTCC

Note that forward and reverse primers are linked to primer A and B (454 Life Sciences; Roche) respectively and contain the TCAG key. To distinguish each sample in the multiplexed UDPS, nine unique sequence tags (MID1 to 9, according Roche's protocol) were inserted between the adaptor A or B and the gene specific primer.

¹RT1: primers under patent process

²Primers from Mitzuya's paper [29]

doi:10.1371/journal.pone.0086771.t001

HIV-1 LAV reference HIV-1 strain (pNL4.3). The mean error rate was calculated using a triplicate experiment and the percentage of variations compared to the plasmid HIV-1 sequence. We estimated an overall mean error rate of $0.21 \pm 0.07\%$ (mean reads per position: 3007 ± 1477). Deletion and insertions events corresponded to 29.8% and 61.9% of the overall errors, with $0.07 \pm 0.06\%$ of deletion and $0.12 \pm 0.07\%$ of insertion relative to total reads. These values are in accordance with the rate of errors generated by the FastStart High Fidelity polymerase [18].

As input HIV RNA was not quantified, the expected sampling error depended on sample viral load. The stochastic effects of sampling variation were limited when the starting RNA copy number was higher than 10,000 copies/mL [6]. Below this threshold, the proportion of sequenced PCR amplicons containing DRMs may not be representative to the original sample.

Drug resistant mutations (DRMs) were thus accepted as significant variants when present at a frequency of $>1\%$ among the total number of reads and in both strands.

Drug resistance mutations and Genotypic Sensitivity Score

Reverse transcriptase and protease DRMs were identified using SS and UDS at baseline and VF. Analyzed mutations associated with resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI), NNRTI and PI were referenced in the 2011 International AIDS Society (IAS)–USA drug resistance mutations list [19]. Genotypic resistance was interpreted with the 2012 ANRS HIV drug resistance algorithm v22 (<http://www.hivfrenchresistance.org>) in order to determine the overall burden of resistance to antiretroviral (ARV) drugs and resistance to the prescribed treatment. The weighted Genotypic Sensitivity Score (wGSS) scores the resistance to the prescribed treatment and was calculated as the sum of the scores obtained for each prescribed ARV drug. In this system, ARV drugs are considered to display full, intermediate or null antiviral activity and scored as 1, 0.5 or 0 for PIs, 1, 0, 0 for NNRTIs and 0.5, 0, 0 for NRTIs [20].

Statistical tests

Paired t-tests were used to compare the mean number of DRMs detected by SS versus UDS for all DRMs, PI-DRMs, NRTI-DRMs and NNRTI-DRMs (Stata 12.1 software).

Results

Study population

Twenty-nine patients achieving VF at least 6 months after initiating first-line ART had plasma samples available at baseline and at VF and were included in our study (**Table 2**). They were mainly men (79.3%) and infected with subtype B HIV-1 in 72.4% of the cases. Median baseline CD4 cell counts (cells/mm³) and median VL (\log_{10} copies/ml) were 248 (interquartile range IQR: 177–314) and 5.0 (IQR: 4.6–5.2) respectively. After a median duration of 14.3 months under therapy (IQR: 8.7–24.2), VF occurred in patients with a median of $3.7 \log_{10}$ copies/ml of HIV RNA (IQR: 3.3–4.0).

Three patients were treated with a 2 NRTI-based regimen, 5 patients with 3 NRTIs, 5 patients with NRTIs + PI, 10 patients with NRTIs + boosted PI and 6 patients with 2 NRTIs + NNRTI. Co-prescribed PIs were Atazanavir, Lopinavir, Nelfinavir or Fosamprenavir and co-prescribed NNRTIs were Efavirenz or Nevirapine.

Sequencing

Sequencing was performed at baseline on the last plasma sample available before ART initiation (median time period between the baseline sample and the start of ART: 28 days, IQR: 8–91) and on the plasma sample corresponding to the date of VF. UDS performed on baseline viral HIV RNA yielded a median of 1663 (IQR: 1017–2533) reads per amplicon (VL range: $3.08 \log_{10}$ cp/ml to $6.62 \log_{10}$ cp/ml), and a median of 1739 (IQR: 1123–2585) reads per amplicon on viral HIV RNA from plasma collected at VF (VL range: $3.01 \log_{10}$ cp/ml to $4.98 \log_{10}$ cp/ml at failure). UDS of the protease region was successful for all of the 29 patients at failure and at baseline but RT UDS failed for 1 patient at baseline.

Comparison of the mean number of DRMs detected by the 2 sequencing techniques (**Figure 1**) revealed that 1.35-fold more DRMs were detected by UDS (1.4-fold more at baseline and 1.3 at VF, $p < 0.0001$). All the DRMs found by SS were also detected by UDS. Additional low-frequency DRMs were found in 21/29 patients at baseline and in 18/29 patients at failure. The difference between the mean number of DRMs detected by SS and by UDS was statistically significant ($p < 0.05$) at baseline for PI and NNRTI-DRMs and at VF for the 3 antiviral drug classes.

Baseline mutations (Tables 3 and 4)

Prevalence of DRMs. Using Sanger sequencing, PI mutations were detected in most of the patients but they were accessory or polymorphic IAS-USA mutations except for Patient 4 who had virus harbouring a major PI mutation. NRTI-DRMs were found in 13.8% (4/29) of the patients and NNRTI-DRMs in 17.2% (5/29). UDS analysis showed that 51.7% (15/29), 3.4% (1/29), 10.7% (3/28) and 25.0% (7/28) of the patients had viruses harbouring additional low-frequency PI-, major PI-, NRTI- and NNRTI-DRMs respectively at baseline. The low-frequency NNRTI-DRMs corresponded to polymorphic Etravirine mutations (V90I, V106I) and Rilpivirine mutations (E138G) in a total of 4 and 2 patients respectively.

These low-frequency DRMs could increase the overall burden of resistance to one or more ARV drugs in 4 of 29 patients (13.8%).

Association of low-frequency DRMs with the prescribed treatment. Among the 21 patients with low-frequency DRMs, 8 had virus harbouring DRMs correlated with the future prescribed treatment. Nevertheless, the wGSS was not modified except for Patient 61 who harboured 2.1% of HIV variants with Y181C mutation that could imply resistance to its NNRTI treatment.

VF mutations (Tables 3 and 4)

Prevalence of DRMs. Using Sanger sequencing, we determined that 20/29 patients had viruses harbouring DRM. Accessory PI mutations were detected in most of the patients but major-PI mutations were found in 17.2% of patients (5/29). NRTI- and NNRTI-DRMs were found in 58.6% (17/29) and 34.5% (10/29) of the patients respectively.

Additional low-frequency PI-, major PI-, NRTI- and NNRTI-DRMs were found by UDS in 44.8% (13/29), 10.3% (3/29), 25% (7/28) and 21.4% (6/28) of the patients respectively. These low-frequency DRMs could increase the overall burden of resistance to one or more ARV drug in 9 of 29 patients (31%).

Association of low-frequency DRMs with the prescribed treatment. Among the 18 patients with low-frequency DRMs, 12 had virus harbouring DRMs correlated with the prescribed treatment. These low-frequency DRMs detected only by UDS led to changes in susceptibility predictions to the prescribed treatment

Table 2. Demographic, clinical and virological characteristics of the included patients (n = 29).

Patients characteristics		n (%)
Gender male, n (%)		23 (79.3%)
Median age, years (IQR)		36.8 (33.0–39.4)
Transmission group, n (%)	MSM	13 (44.8%)
	IDU	5 (17.3%)
	Heterosexual	9 (31.0%)
	Other	2 (6.9%)
HIV-1 B subtype, n (%)		21 (72.4%)
Antiretroviral treatment, n (%)	2 NRTIs	3 (10.3%)
	3 NRTIs	5 (17.2%)
	2 NRTI + PI	3 (10.3%)
	3 NRTI + PI	2 (6.9%)
	2 NRTI + PI/r	8 (27.6%)
	3 NRTI + PI/r	2 (6.9%)
Period of ART initiation	2 NRTI + NNRTI	6 (20.8%)
	<2003	17 (58.6%)
	≥2003	12 (41.4%)
Median baseline plasma HIV-1 RNA, log ₁₀ copies/ml (IQR)		5.0 (4.6–5.2)
Median baseline CD4 cell count, cells/mm ³ (IQR)		248 (177–314)
Median VF plasma HIV-1 RNA, log ₁₀ copies/ml (IQR)		3.7 (3.3–4.0)
Median time between baseline and VF, month (IQR)		14.3 (8.7–24.2)

MSM: men who have sex with men, IDU: intravenous drug user, IQR: interquartile range, VF: virological failure
doi:10.1371/journal.pone.0086771.t002

in 6/29 patients (20.7%), as shown by their VF UDS GSS lower than their VF SS GSS. Patients 14, 49 and 64 presented in their viral population 4.3% of M184I, 2.7% and 3.8% of M184V respectively that could be involved in resistance to the prescribed Lamivudine. Abacavir resistance was identified in Patient 46 who harboured 3% of viruses with L74V mutation and in Patient 86 who was infected with 34.9% of viruses carrying Y115F mutation. In Patient 40, 5 high-frequency PI-DRMs were found, leading to possible resistance to Lopinavir. The detection of 5% of variants with the additional Lopinavir resistance mutation L10V could explain an increase on resistance to this PI.

Taking into account both high-frequency and low-frequency DRMs, 8 patients (Patients 16, 23 25, 28, 31, 41, 47 and 85) had no resistance to their prescribed treatment, and 4 had even no DRMs related to their prescribed treatment (Pt 16, 28, 47 and 85)

Evolution of the low-frequency DRMs between baseline and virological failure

Among the 38 additional low-frequency DRMs detected at baseline, 9 were related to the future prescribed treatment (8 patients). Among them, 1/5 PI-DRMs (Patient 23), 2/3 NRTI-DRMs (Patients 25 and 80) and 1/1 NNRTI-DRMs (Patient 61) were also detected at VF. All the PI-DRMs were accessory PI-DRMs. In the unique subject with baseline low-frequency NNRTI-DRM that could lead to resistance to the prescribed ART (Patient 61, Y181C at 2.1%), both UDS and SS performed at virological failure showed the evolution of this mutation which was detected at high frequency (97.4%).

Most of the treatment-related mutations found at VF were not detected at baseline by UDS. In 75% of the cases (21/28), VF was associated with the occurrence of NRTI DRMs, mainly the M184I/V mutation. Among the 26 patients receiving Emtricitabine (FTC) or Lamivudine (3TC), viruses harbouring the M184I/V mutation at VF were found in 14 patients by both SS and UDS and in 3 patients by UDS only. However, this M184 mutation was never detected at baseline by UDS. Pre-existing low-frequency TAM-NRTI mutations were found in 2/5 patients from whom high level of TAMs were detected at VF (4% and 2.5% baseline M41L; Patient 25 and 80). Concerning the 4 patients with NNRTI-DRMs at VF, only one (Patient 61) had pre-existing low-frequency NNRTI-DRM at baseline. Among the 5 patients treated with PI-based regimen with viruses harbouring major PI-DRMs related to their treatment, none of these PI-DRMs was detected by UDS at baseline. Most of the polymorphic PI-DRMs were already detected at baseline by both SS and UDS.

Discussion

Our study gave new insights on the distribution of low-frequency variants harbouring PI-, NRTI- and NNRTI-DRMs present prior to first-line therapy and at virological failure, with emphasis on the evolution of these DRMs under ARV therapy. More than two-thirds of the patients presented additional low-frequency DRMs only detected by UDS, with 1.4-fold more DRMs detected by UDS at baseline and 1.3 fold more at VF. This increased prevalence of DRMs was in concordance with previous reports describing the abundance of low-frequency resistant variants (representing less than 20% of viral population), especially detected by UDS, on treatment-naïve patients [10,11,16] as well as on treatment-experienced patients [21–24], confirming the high sensitivity of this technique for the detection and quantification of DRMs. These low-frequency DRMs detected only by UDS could increase the overall burden of resistance to ARV drugs in 13.8% of the patients at baseline and 31% at VF. However, they led to

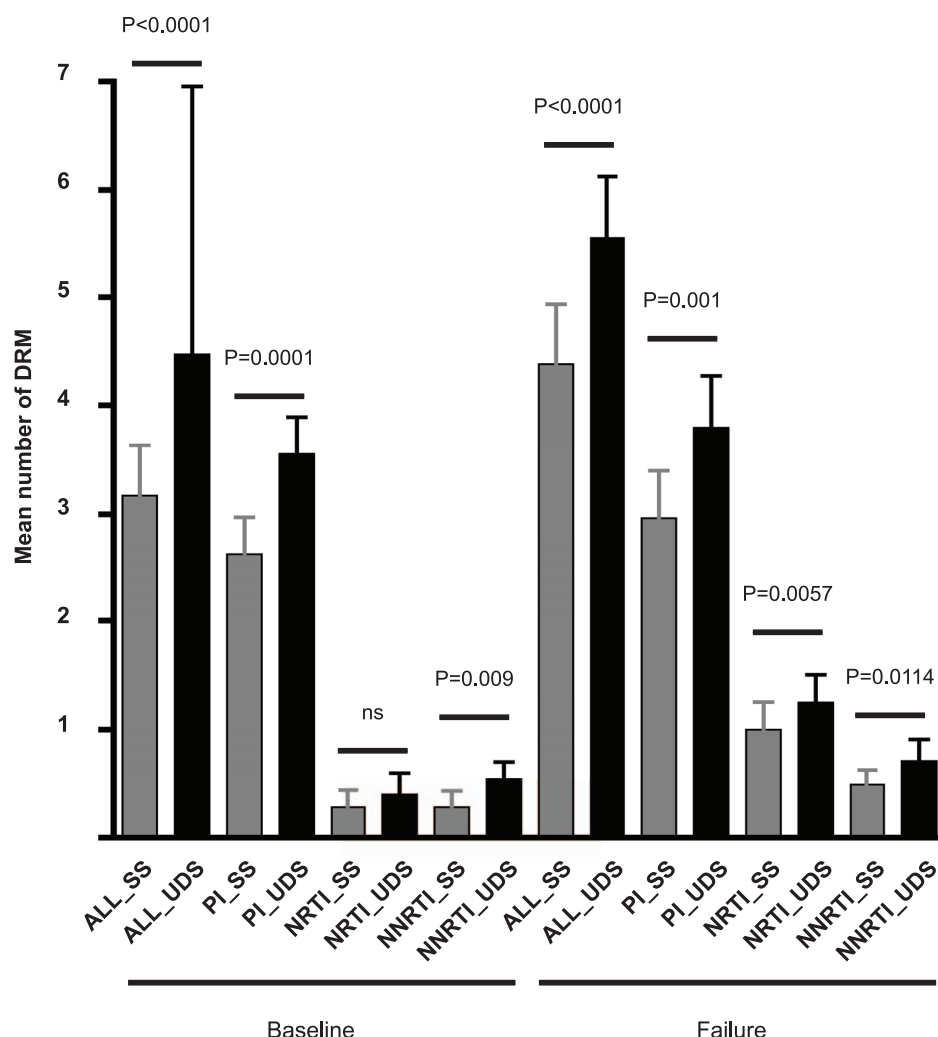


Figure 1. Drug resistant mutations (DRMs) detected by Sanger sequencing (SS) and ultra-deep sequencing (UDS). Mean of DRMs per patients were obtained. Two-tailed p values and 95% confidence intervals were calculated from the paired Student t-test (ns: not statistically significant, $p > 0.05$). ALL_SS and ALL_UDS: all DRMs detected by SS and UDS respectively PI_SS and PI_UDS: Protease inhibitor (PI)-DRMs detected by SS and UDS respectively NRTI_SS and NRTI_UDS: Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor (NRTI)-DRMs detected by SS and UDS respectively. NNRTI_SS and NNRTI_UDS: Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor (NNRTI)-DRMs detected by SS and UDS respectively.
doi:10.1371/journal.pone.0086771.g001

changes in susceptibility predictions to the prescribed treatment only in 3.5% of the patients at baseline and 20.7% at VF.

Twenty-six patients had a 3TC/FTC backbone in their regimen. The M184I/V mutation was detected in 17 of them at failure (only by UDS in 3 of them). Nevertheless, we never detected this mutation on samples collected prior to treatment even at low frequency. The absence of the M184V mutation in baseline circulating viruses is not in agreement with previous reports describing the detection of low-frequency variants carrying M184V mutations in acute [7,25] and chronically infected naive patients [9]. One explanation could be the difference of the ultrasensitive assay used. In these studies, allele-specific PCR was performed for M184V detection, with detection threshold lower than our 1% cut-off. Simen *et al* found a very low prevalence of M184V/I by UDS in chronically infected naive patients [11]. We could also hypothesize that this lack of M184I/V-harboring viruses in treatment-naive patients may be a result of the high fitness cost of the M184V virus, which severely impairs replicative capacity [21]. Longer time periods between seroconversion, and

then transmission of putative M184V variants, and plasma collection for baseline UDS in our study could lead, in the absence of selective drug pressure, to the decay of these low-replicative variants to very low levels (under the limit of detection of UDS) or even its elimination from the plasma.

One of the main questions sparked by these new ultrasensitive assays remains the significance and the clinical relevance of these low-frequency DRMs, and especially their role in subsequent virological failure.

In our study, 4/29 patients had viruses harbouring low-frequency NRTI- or NNRTI-DRMs related to the prescribed treatment at baseline and these DRMs were found at high frequency at VF in 3 of them. Moreover, for the unique patient with viruses harbouring low-frequency DRM at baseline (Y181C at 2.1%) which may lead to a resistance to his future treatment by NNRTI, this mutation was found at high frequency (97.4%) by both UDS and SS at virological failure.

The impact of low-frequency DRMs on the subsequent response to ARV likely depends on the percentage of low-

Table 3. List of drug resistance mutations (DRM) detected at baseline (BL) and virological failure (VF) by Sanger sequencing (SS) and UDS for patients failing a PI-based regimen (n = 15).

Pt.	BL VL (cp/ml)	Baseline DRM SS and UDS (%)		ART	VF VL (cp/ml)	VF DRM SS and UDS (%)		NRTI	NNRTI	VF GSS	SS	UDS
		Protease	SS			Protease	SS					
4	125416	L10I, M36I, D60E, L63P, <u>A71T, G48V</u>	2	ZDV 3TC DDI NFV	5914	L10I, M36I, D60E, L63P, <u>A71T, G48V, V82A</u>	0.5	M41L, D67N, <u>L210W, T215Y, M184V</u>	V179T	0.5	0.5	0.5
14	1292950	M36I, I62V, L63P, <u>A71T, V77I</u>	2.5	ZDV 3TC ABC NFV	8435	M36I, I62V, L63P, <u>A71T, V77I</u>	2.5	M184I (4.3)	Y188C (2.0)	2.5	2	2
16	20103	V77I, <u>L63P (1.5)</u>	2.5	ZDV 3TC ABC LPV/r	1170	V77I	2.5	0	0	2.5	2.5	2.5
23	121221	<u>M36I (13.1), A71T (11.2)</u>	2	ZDV 3TC NFV	2414	<u>M36I (15.4)</u>	2	0	0	2	2	2
25	119112	G16E, I62V, <u>L63P, V77I</u>	2	3TC TDF LPV/r	97597	G16E, I62V, L63P, <u>V77I, D60E (1.5)</u>	2	L210W, T215D, <u>M41L</u>	0	2	2	2
31	198233	L10V, G16E, K20I, M36I, <u>H69K, L89M</u>	2	ZDV 3TC LPV/r	59663	L10V, G16E, K20I, M36I, <u>H69K, L89M</u>	2	0	0	2	2	2
40	96878	K20R, M36I, I62V, <u>L63P, M36L (2.1)</u>	2	ZDV 3TC LPV/r	2021	K20R, M36I, I62V, L63P, <u>M46L, I54V, V82A, L10V (5.0)</u>	0.5	M184V	0	1.5	0.5	0.5
41	771	<u>K20I, M36I, H69K, L89M</u>	2	3TC TDF ATZ/r	1530	K20I, M36I, H69K, L89M	2	0	0	2	2	2
43	83525	K20I, M36I, H69K, L89M	2	ZDV 3TC NFV	9819	K20I, M36I, H69K, L89M, D60E, L63P, <u>I54V, L90M, L89I (26.3), M46L (5.0)</u>	0.5	M184V	0	0.5	0.5	0.5
46	140551	<u>M36I (1.0)</u>	2.5	ZDV 3TC ABC LPV/r	14505	M36I, <u>V11I (1.5)</u>	2.5	<u>L74V (3.0)</u>	0	2.5	2	2
49	232736	K20R, V77I, <u>M36I (32.6), L63P (3.4)</u>	2	3TC ABC FPV/r	2387	V77I	2	M184I (2.7)	V90I	2	1.5	1.5
51	19200	G16E, K20R, M36I, I62V (8.5), <u>V77I (4.6)</u>	2	TDF FTC LPV/r	12796	G16E, K20R, M36I, <u>V77I (1.9)</u>	1.5	M184V, <u>M184I (2.2)</u>	K101E (6.8)	1.5	1.5	1.5
52	782200	I62V, L63P, V77I, <u>M36I (1.3)</u>	2	TDF FTC ATZ/r	2155	I62V, L63P, V77I, <u>N88S, M46L (18.8), M46I (8.3), A71V (9.2), G73S (24.1)</u>	0.5	M184V	0	0.5	0.5	0.5
57	142700	M36I, I62V, <u>L63P, A71T, V77I</u>	2	ZDV 3TC LPV/r	4861	M36I, I62V, L63P, <u>A71T, V77I, G16E (1.6)</u>	1.5	M184V	0	1.5	1.5	1.5
79	1108000	<u>M36I, L63P, G16E (19.3), K20T (5.1), I62V (5.8), V77I (4.4)</u>	2	DDI D4T NFV	1693	M36I, L63P, <u>D30N</u>	0.5	D67N, T215D, <u>M184V</u>	V90I	0.5	0.5	0.5

Italic: mutations only detected by UDS/Normal: mutations detected by both UDS and SS**Bold:** Major protease mutationsUnderlined: mutations associated to prescribed treatmentGSS: Genotypic Sensitivity Score; ART, antiretroviral treatment; ZDV, zidovudine; DDI, didanosine; D4T, stavudine; 3TC, lamivudine; FTC: Emtricitabine; ABC, abacavir; TDF, tenofovir; NFV, nevirapine; LPV/r, boosted lopinavir; ATZ/r, boosted atazanavir; FPV/r, boosted fosamprenavir
doi:10.1371/journal.pone.0086771.t003

Table 4. List of drug resistance mutations (DRM) detected at baseline (BL) and virological failure (VF) by Sanger sequencing (SS) and UDS for patients failing a NNRTI-based regimen (n = 6) or NRTI-based regimen (n = 8).

Pt.	BL VL (cp/ml)	Baseline DRM SS and UDS (%)		ART	BL GSS		VF VL (cp/ml)	VF DRM SS and UDS (%)		VF GSS	
		Protease	NNRTI		SS	UDS		Protease	NRTI	NNRTI	SS
20	45028	L63P, L33V (6.4), M36I (24.8)	0	0	2	2	ZDV 3TC NVP	6572	L63P, M36I (6.9) M184V	K103N, H221Y, M230L, V90I (14.5)	0.5
28	49268	0	0	0	1.5	1.5	ZDV 3TC ABC	88025	G16E (2.7), L33V (2.6), M36I (1.8), V77I (2.0)	0	1.5
38	38779	M36I	0	0	1.5	1.5	ZDV 3TC ABC	9132	M184V	0	1
47	1324	K20I, M36I, H69K, L89M	0	0	2	2	3TC FTC EFV	2160	K20I, M36I, H69K, L89M	0	2
61	33676	K20I, M36I, H69K, L89M, G16E (1.1)	0	Y181C (2.1)	2	1	3TC D4T NVP	533	M184I	Y181C, V90I	0.5
62	67288	L63P, D60E (8.5), I62V (3.0), V77I (12.0)	0 [#]	V90I [#]	2	2	ZDV 3TC NVP	10371	I62V, L33V (2.9), L63P (35.3)	Y181C, V90I, K101E (4.2)	1
63	88509	G16E, M36I, I62V, H69K, K20R (11.6)	ND	ND	ND	ND	ZDV 3TC ABC	676	M184V [*]	0 [*]	1
64	141586	V11I, K20I, M36I, H69K, L89M, V77I (6.7)	0 [#]	0 [#]	2	2	3TC TDF EFV	41115	M184V (3.8)	G190S, V90I (45.0)	0.5
76	15857	I62V, M36I (2.7), Q58E (2.5), L63P (2.3)	0	V106I (11.0), V90I (1.9)	1	1	ZDV 3TC	2438	I62V	M184V, K70R (15.2)	0.5
80	1607	D60E, L63P	D67N, K70R, T215Y, K219E, M41L (2.6)	0	0	0	DDI D4T	2033	D60E, L63P	D67N, K70R, T215Y, K219E, M41L	0
82	586670	L63P, V77I	L210W (9.0)	K103N	1.5	1.5	ZDV 3TC ABC	2667	L63P, V77I, D60E (2.8)	K103N	1
83	6741	L63P, K20R (4.0), M36I (7.5)	0	V90I (6.6)	1	1	ZDV 3TC	1812	L63P	0	0.5
85	147650	0	0	V90I (2.2)	2	2	3TC TDF EFV	3306	0	V90I	2
86	57839	V77I	0	E138G (1.1)	1.5	1.5	ZDV 3TC ABC	6540	M184V, Y115F (34.9)	V90I, H221Y (8.6)	0.5

*UDS failed for this sample. Only DRMs detected by SS were listed.

[#]For technical reasons, E138 position was not read by UDS.*Italic*: mutations only detected by UDS/Normal; mutations detected by both UDPS and SS.**Bold**: Major protease mutations.

Underlined: mutations associated to prescribed treatment.

GSS, Genotypic Sensitivity Score; ART, antiretroviral treatment; ZDV, zidovudine; DDI, didanosine; D4T, stavudine; 3TC, lamivudine; FTC, Emtricitabine; ABC, abacavir; TDF, tenofovir; EFV, efavirenz; NVP, nevirapine.

doi:10.1371/journal.pone.0086771.t004

frequency resistant variants and/or on the mutational viral load [14,15]. A recent pooled analysis found an increased risk of VF even at very low NNRTI-DRMs frequencies, but showed a dose-dependent effect of low-frequency DRMs with a significantly higher risk of VF with the presence of low-frequency variant at 1% or greater [15]. In our study, we chose to report only low-frequency DRM present at a threshold greater than 1%, to select the mutations with potentially stronger impact on virological outcome, but also to exclude mutations related to laboratory artefact from reverse transcription, PCR amplification and/or sequencing [18,26].

The impact on the virological outcome probably also depends on treatment regimen.

Many studies clearly report a strong and significant association between low-frequency NNRTI-DRMs and a higher risk of virological failure in patients treated by NNRTI-based regimen [10–15,27] even with high levels of adherence [28].

The few studies that evaluated the impact of low-frequency PI-DRMs on PI-based regimen found no associations with an increased risk of treatment failure [11,16]. In our study, PI-DRMs found by UDS in ARV-naïve patients were mainly accessory IAS-USA mutations. These accessory PI mutations are polymorphic but their accumulation could impact the susceptibility to some PI such as Lopinavir or Nelfinavir. In addition, none of the major PI-DRMs present at virological failure were detected at low frequency prior to treatment. Nevertheless, major PI-DRMs were present at low frequency at virological failure in 5/15 patients treated with a PI-based regimen. The additional accessory PI-DRMs only detected by UDS at VF led to changes in susceptibility predictions to the prescribed PI in one of the 15 patients and might explain virological failure.

Others studies have shown that low-frequency variants harbouring major PI-mutations are infrequently detected by UDS (most of them are accessory mutations with low Stanford HIVdb scores) and occurred in isolation in ARV-naïve patients and in patients experiencing failure on PI boosted-regimen [16,24]. A study reported that samples with low-frequency PI-DRMs (identified with Stanford-HIVdb weights >12 for Atazanavir and Lopinavir) remained phenotypically susceptible to PIs. This might be explained by the fact that these low-frequency PI-DRMs have been found at levels lower than 0.5–1% [24].

The very low prevalence of variants harbouring major PI-DRMs at significant levels combined with the high genetic barrier to resistance of PI could explain the fact that studies failed to show an impact of low-frequency PI-DRMs on virological response to boosted-PI based regimens. Further studies are needed to determine if the existence of major PI-DRMs present at low frequency could affect the efficacy of PI/r containing regimens.

Our work has several limitations.

First, the ability to detect low-frequency variants depends on initial VL and on the amount of RNA copies used for RT-PCR. We were not able to quantify the number of RNA copies submitted to amplification procedure. Based on previously published data that consider RNA extraction efficiency, we assumed that the approximate number of templates derived from a sample with plasma HIV-1 RNA levels ≥ 4.5 log copies/mL and submitted to UDS was around 100–200 copies [6,29,30]. The number of RNA templates used for UDS may not be a limiting factor for low-frequency DRMs detection from baseline samples since 76% of them had VL above 4.5 log copies/mL. However, 86% of the failure samples had VL below 4.5 log copies/mL and thus, the probability of finding low-frequency DRMs on these samples may have been then reduced. In addition, the detected low-frequency DRMs could have been over-estimated due to

sampling error and selection bias. However, the low-frequency DRMs associated to the treatment detected at failure were in most of the cases found at level $>2.5\%$, increasing the confidence on their reliability.

Secondly, patients were included if they experienced a VF on first-line therapy. The prevalence of low-frequency DRMs on this group of patients was not compared to a control group of patients with virological suppression. Hence, we could not evaluate the impact of the drug resistant low-frequency DRMs on virological outcome. Because of the small number of patients experiencing VF under a first-line ART for whom plasma samples were available both at baseline and VF, only 29 subjects were included in our study. Besides almost 45% of them received an antiretroviral therapy dating back from 2000 which is not state of the art anymore.

Finally, adherence to HAART was not reported. Eight patients had no ARV drug resistance suggesting that their VF was related to non-adherence to treatment. Besides, most of the DRMs found at VF under first-line ARV therapy did not exist prior to treatment and were probably acquired through drug selection pressure, favoured by poor adherence or pharmacokinetic factors. Adherence to antiretroviral therapy is a major predictor of viral suppression and disease progression [31]. Low-frequency NNRTI-DRMs increased the risk of VF across all adherence categories, especially in high level of adherence [28]. Thus this essential parameter has to be taken in consideration for further studies.

In conclusion, UDS identified significantly more DRMs than SS for each class of ARV (NRTI, NNRTI and PI), both in treatment-naïve patients and in patients who experienced virological failure on first-line ARV. In few cases, these additional low-frequency DRMs may change the ARV susceptibility predictions to the prescribed treatment.

Large prospective studies are now needed to assess the impact of these low-frequency DRMs on virological response, according to the proportion of each DRM and to the composition of the ARV regimen, before applying these ultrasensitive assays in routine clinical practice.

Acknowledgments

The authors wish to thank all the patients enrolled in ANRS CO3 cohort without whom this work would not have been possible. They are also grateful to Stéphane Geffard and to Fabien Le Marec for data extractions and statistical support and Suzanne Ingle for linguistic assistance.

We would like to dedicate this manuscript to Bernard Masquelier (1963–2013), a bright virologist and mentor.

Composition of the ANRS CO3 Aquitaine Cohort and the Groupe d'Epidémiologie Clinique du SIDA en Aquitaine (GECSA): Coordination: F. Dabis. Epidemiology and Methodology: M. Bruyand, G. Chêne, F. Dabis, S. Lawson-Ayayi, R. Thiébaud, L. Wittkop. Infectious Diseases and Internal Medicine: K. André, F. Bonnal, F. Bonnet, N. Bernard, L. Caunègre, C. Cazanave, J. Ceccaldi, I. Chossat, K. Courtaud, FA. Dauchy, S. De Witte, M. Dupon, A. Dupont, P. Duffau, H. Dutronc, S. Farbos, V. Gaborieau, MC. Gemain, Y. Gerard, C. Greib, M. Hessamfar, D. Lacoste, P. Lataste, E. Lazaro, M. Longy-Boursier, D. Malvy, JP. Meraud, P. Mercié, E. Monlun, P. Morlat, D. Neau, A. Ochoa, JL. Pellegrin, T. Pistone, MC. Receveur, J. Roger Schmeltz, S. Tchamgoué, MA. Vandenhende, MO. Vareil JF. Viallard. Immunology: JF. Moreau, I. Pellegrin. Virology: H. Fleury, ME. Lafon, B. Masquelier, S.Reigadas, P. Trimoulet. Pharmacology: S. Bouchet, D. Breilh, M. Molimard, K. Titier. Drug monitoring: F. Haramburu, G. Miremont-Salamé. Data collection and processing: MJ. Blaizeau, M. Decoin, J. Delaune, S. Delveaux, C. D'Ivernois, C. Hanapier, O. Leleux, E. Lenaud, B. Uwamaliya-Nziyuvira, X Sicard. Computing and Statistical analysis: S. Geffard, F. Le Marec. V. Conte, A. Frosch, J. Leray G. Palmer, D. Touchard (CREDIM-ISPED). Scientific committee: Prs F. Bonnet, D. Breilh, G.

Chêne, F. Dabis, M. Dupon, H. Fleury, D. Malvy, P. Mercié, P. Morlat, D. Neau, I. Pellegrin, J.L. Pellegrin, Drs S. Bouchet, V. Gaborieau, D. Lacoste, S. Tchamgoué et R. Thiebaut.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MAV PB PRP MB PM BM. Performed the experiments: MAV PB PRP. Analyzed the data: MAV PB PRP SR HF BM. Contributed reagents/materials/analysis tools: YB MB FB EL DN HF FD PM BM. Wrote the paper: MAV PB BM.

References

1. Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, et al. (1998) Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 338: 853–860.
2. Hogg RS, Bangsberg DR, Lima VD, Alexander C, Bonner S, et al. (2006) Emergence of drug resistance is associated with an increased risk of death among patients first starting HAART. *PLoS Med* 3: e356.
3. Vercauteren J, Wensing AM, van de Vijver DA, Albert J, Balotta C, et al. (2009) Transmission of drug-resistant HIV-1 is stabilizing in Europe. *J Infect Dis* 200: 1503–1508.
4. Thompson MA, Aberg JA, Hoy JF, Telenti A, Benson C, et al. (2012) Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2012 recommendations of the International Antiviral Society-USA panel. *JAMA* 308: 387–402.
5. Palmer S, Kearney M, Maldarelli F, Halvas EK, Bixby CJ, et al. (2005) Multiple, linked human immunodeficiency virus type 1 drug resistance mutations in treatment-experienced patients are missed by standard genotype analysis. *J Clin Microbiol* 43: 406–413.
6. Wang C, Mitsuya Y, Gharizadeh B, Ronaghi M, Shafer RW (2007) Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: application to HIV-1 drug resistance. *Genome Res* 17: 1195–1201.
7. Peuchant O, Thiebaut R, Capdepon S, Lavignolle-Aurillac V, Neau D, et al. (2008) Transmission of HIV-1 minority-resistant variants and response to first-line antiretroviral therapy. *AIDS* 22: 1417–1423.
8. Jakobsen MR, Tolstrup M, Sogaard OS, Jorgensen LB, Gorrry PR, et al. (2010) Transmission of HIV-1 drug-resistant variants: prevalence and effect on treatment outcome. *Clin Infect Dis* 50: 566–573.
9. Metzner KJ, Rauch P, Braun P, Knechten H, Ehret R, et al. (2011) Prevalence of key resistance mutations K65R, K103N, and M184V as minority HIV-1 variants in chronically HIV-1 infected, treatment-naïve patients. *J Clin Virol* 50: 156–161.
10. Johnson JA, Li JF, Wei X, Lipscomb J, Irlbeck D, et al. (2008) Minority HIV-1 drug resistance mutations are present in antiretroviral treatment-naïve populations and associate with reduced treatment efficacy. *PLoS Med* 5: e158.
11. Simen BB, Simons JF, Hullsiek KH, Novak RM, Macarthur RD, et al. (2009) Low-abundance drug-resistant viral variants in chronically HIV-infected, antiretroviral treatment-naïve patients significantly impact treatment outcomes. *J Infect Dis* 199: 693–701.
12. Metzner KJ, Giulieri SG, Knoepfel SA, Rauch P, Burgisser P, et al. (2009) Minority quasiespecies of drug-resistant HIV-1 that lead to early therapy failure in treatment-naïve and -adherent patients. *Clin Infect Dis* 48: 239–247.
13. Paredes R, Lalama CM, Ribaud HJ, Schackman BR, Shikuma C, et al. (2010) Pre-existing minority drug-resistant HIV-1 variants, adherence, and risk of antiretroviral treatment failure. *J Infect Dis* 201: 662–671.
14. Goodman DD, Zhou Y, Margot NA, McColl DJ, Zhong L, et al. (2011) Low level of the K103N HIV-1 above a threshold is associated with virological failure in treatment-naïve individuals undergoing efavirenz-containing therapy. *AIDS* 25: 325–333.
15. Li JZ, Paredes R, Ribaud HJ, Svarovskaia ES, Metzner KJ, et al. (2011) Low-frequency HIV-1 drug resistance mutations and risk of NNRTI-based antiretroviral treatment failure: a systematic review and pooled analysis. *JAMA* 305: 1327–1335.
16. Lataillade M, Chiarella J, Yang R, Schnitman S, Wirtz V, et al. (2010) Prevalence and clinical significance of HIV drug resistance mutations by ultra-deep sequencing in antiretroviral-naïve subjects in the CASTLE study. *PLoS One* 5: e10952.
17. Thiebaut R, Morlat P, Jacqmin-Gadda H, Neau D, Mercie P, et al. (2000) Clinical progression of HIV-1 infection according to the viral response during the first year of antiretroviral treatment. Groupe d'Epidemiologie du SIDA en Aquitaine (GECSA). *AIDS* 14: 971–978.
18. Vandenbroucke I, Van Marck H, Verhasselt P, Thys K, Mostmans W, et al. (2011) Minor variant detection in amplicons using 454 massive parallel pyrosequencing: experiences and considerations for successful applications. *Biotechniques* 51: 167–177.
19. Johnson VA, Calvez V, Gunthard HF, Paredes R, Pillay D, et al. (2011) 2011 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top Antivir Med* 19: 156–164.
20. De Luca A, Cingolani A, Di Giambenedetto S, Trotta MP, Baldini F, et al. (2003) Variable prediction of antiretroviral treatment outcome by different systems for interpreting genotypic human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *J Infect Dis* 187: 1934–1943.
21. Le T, Chiarella J, Simen BB, Hanczaruk B, Egholm M, et al. (2009) Low-abundance HIV drug-resistant viral variants in treatment-experienced persons correlate with historical antiretroviral use. *PLoS One* 4: e6079.
22. Codoner FM, Pou C, Thielens A, Garcia F, Delgado R, et al. (2011) Added value of deep sequencing relative to population sequencing in heavily pre-treated HIV-1-infected subjects. *PLoS One* 6: e19461.
23. Varghese V, Shahriar R, Rhee SY, Liu T, Simen BB, et al. (2009) Minority variants associated with transmitted and acquired HIV-1 nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance: implications for the use of second-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J Acquir Immune Defic Syndr* 52: 309–315.
24. Lataillade M, Chiarella J, Yang R, DeGrosky M, Uy J, et al. (2012) Virologic failures on initial boosted-PI regimen infrequently possess low-level variants with major PI resistance mutations by ultra-deep sequencing. *PLoS One* 7: e30118.
25. Metzner KJ, Rauch P, Walter H, Boesecke C, Zollner B, et al. (2005) Detection of minor populations of drug-resistant HIV-1 in acute seroconverters. *AIDS* 19: 1819–1825.
26. Gianella S, Delpont W, Pacold ME, Young JA, Choi JY, et al. (2011) Detection of minority resistance during early HIV-1 infection: natural variation and spurious detection rather than transmission and evolution of multiple viral variants. *J Virol* 85: 8359–8367.
27. Halvas EK, Wiegand A, Boltz VF, Kearney M, Nissley D, et al. (2010) Low frequency nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor-resistant variants contribute to failure of efavirenz-containing regimens in treatment-experienced patients. *J Infect Dis* 201: 672–680.
28. Li JZ, Paredes R, Ribaud HJ, Svarovskaia ES, Kozal MJ, et al. (2012) Relationship between minority nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutations, adherence, and the risk of virologic failure. *AIDS* 26: 185–192.
29. Mitsuya Y, Varghese V, Wang C, Liu TF, Holmes SP, et al. (2008) Minority human immunodeficiency virus type 1 variants in antiretroviral-naïve persons with reverse transcriptase codon 215 revertant mutations. *J Virol* 82: 10747–10755.
30. Vandenbroucke I, Eygen VV, Rondelez E, Vermeiren H, Baelen KV, et al. (2008) Minor Variant Detection at Different Template Concentrations in HIV-1 Phenotypic and Genotypic Tropism Testing. *Open Virol J* 2: 8–14.
31. Lima VD, Harrigan R, Bangsberg DR, Hogg RS, Gross R, et al. (2009) The combined effect of modern highly active antiretroviral therapy regimens and adherence on mortality over time. *J Acquir Immune Defic Syndr* 50: 529–536.

PARTIE II : IMPACT PRONOSTIQUE D'UNE CHARGE VIRALE DE FAIBLE NIVEAU PERSISTANTE SUR L'EVOLUTION VIROLOGIQUE ET CLINIQUE

A. CONTEXTE

L'objectif d'un traitement antirétroviral est d'obtenir et de maintenir une charge virale plasmatique indétectable [2,31,73] afin de permettre la restauration du système immunitaire et ainsi une réduction de la morbidité et de la mortalité associée au VIH [1]. L'amélioration des techniques de quantification de la CV a permis la diminution progressive au cours des années du seuil de détection et de quantification de la CV VIH plasmatique, actuellement en 2015 de l'ordre de 20 à 50 copies/ml en routine.

Une proportion non négligeable de patients VIH sous traitement ARV (y compris les patients ayant une observance optimale sous un traitement ARV puissant sans notion de résistance antérieure du virus) présente des épisodes de virémie détectable de faible niveau, entre 50 et 500 copies/ml. Ces CV de faible niveau peuvent survenir soit de façon transitoire (la CV détectable étant suivie et précédée d'une mesure de CV indétectable, phénomène qualifié de blip) chez 20-50% des patients, soit de façon plus persistante, confirmées sur plusieurs prélèvements consécutifs, chez 4 à 10 % des patients (phénomène qualifié de charge virale de faible niveau persistante ou CVF) [26-30].

La survenue de ces CVF soulève des questions importantes en termes de prise en charge en pratique clinique et de recherche : quelle est l'origine de ces CVF ? Quelles sont les conséquences de la survenue d'une CVF? Quelle est leur prise en charge optimale ? Quel est le seuil optimal de suppression virologique et par conséquent quel est le seuil définissant l'échec virologique?

L'origine des virémies de faible niveau est multifactorielle, ces virémies pouvant être secondaires à :

➤ Un aléa technique :

- Temps avant le traitement de l'échantillon

La centrifugation du sang total pour séparation du plasma devrait être idéalement réalisée au maximum dans les 24h après le prélèvement. Portman *et al* ont ainsi rapporté une nette augmentation de la prévalence des virémies de faible niveau lorsque le temps de traitement de l'échantillon était supérieur à 24h (90% des échantillons techniques à 28h avaient une CV>40 copies/ml (57% avec une CV>200 copies/ml) vs 10% des échantillons techniques avant 4h (0% avec une CV>200 copies/ml) [74]

- Type de tubes utilisés : tubes PPT (Plasma Preparation Tubes) vs tubes EDTA

De multiples observations rapportent une CV plus élevée en cas d'utilisation de tubes PPT en comparaison aux tubes EDTA, correspondant à une élévation artificielle de la CV liée aux tubes PPT par coamplification d'acides nucléiques viraux (ARN et ADN) associés aux cellules. L'utilisation de tubes PPT nécessite une recentrifugation des tubes après le transport avant décantation et congélation [75,76].

- Type de techniques virologiques de quantification de la CV

Les techniques de quantification de la CV de 3^{ème} génération (RealTime PCR) les plus utilisées actuellement en pratique clinique sont la technique Abbott RealTime HIV-1 (limite inférieure du seuil de quantification (LISQ) à 40 cp/ml) et la technique Roche Cobas AmpliPrep/Cobas Taqman (CAP/CTM) HIV-1 version 2.0 (LISQ à 20 cp/ml), ayant remplacé la technique de 2^{ème} génération : Roche Cobas Ampliprep Amplicor HIV-1 Monitor version 1.5 (LISQ : 50 cp/ml). De nombreuses études comparant ces techniques rapportent une variabilité intra-technique des résultats pour les CV de faible niveau (augmentation des coefficients de variation à la LISQ de la technique avec problèmes de reproductibilité), ainsi qu'une variabilité entre les

différentes techniques ultrasensibles utilisées avec une plus grande sensibilité de Roche Taqman CAP/CTM v2.0, conduisant à une augmentation significative du nombre de patients présentant des virémies détectables transitoires en utilisant cette technique [77-80].

Néanmoins, si la détection d'un blip peut être imputée à un problème technique (lié à la variabilité de la technique au seuil inférieur de quantification ou à un problème de traitement de l'échantillon) et doit être systématiquement confirmée sur un deuxième prélèvement, la confirmation d'une virémie de faible niveau sur plusieurs prélèvements successifs est en faveur d'une véritable CVF persistante et non d'un simple aléa technique.

➤ Un traitement ARV suboptimal, pouvant être secondaire à :

- Des problèmes ponctuels d'observance
- Des problèmes pharmacocinétiques, par malabsorption ou interactions médicamenteuses
- Un défaut de puissance intrinsèque du traitement ARV

Le défaut de puissance du traitement ARV est un facteur connu d'échec virologique [81,82]. Il a notamment été montré qu'avec des traitements virologiquement moins puissants comme la monothérapie d' IP/r (Darunavir, Lopinavir ou Atazanavir), le pourcentage de patients avec une virémie entre 50 et 500 copies/ml était plus important comparé à celui de patients recevant une trithérapie standard en première ligne et aussi en maintenance [83-85]. La diminution au fil du temps du taux d'échec virologique est la conséquence du développement de molécules plus puissantes et mieux tolérées et de l'amélioration des associations thérapeutiques [2-4].

- La présence de variants viraux résistants [86]

Il faut souligner que ces variants viraux résistants peuvent ne pas être détectés par les techniques génotypiques standards s'ils sont présents dans le plasma à taux minoritaire, inférieur à 15-25% (variants viraux résistants minoritaires nécessitant des techniques plus sensibles pour leur

détection, comme le séquençage ultrasensible ou UDS, la PCR spécifique d'allèle ou le séquençage à une copie) ou archivés dans de cellules lymphocytaires quiescentes.

- La persistance d'une réplication virale locale dans certains compartiments anatomiques :

Cette réplication persistante peut être secondaire à un défaut de pénétration des ARV dans ces sites qui constituent des sanctuaires thérapeutiques [87] (tels que le système nerveux central [88,89], les tissus lymphoïdes du tube digestif [90], ou encore le tractus génital [91]). Du fait d'une pénétration variable des ARV dans ces sites anatomiques, l'utilisation de molécules antirétrovirales diffusant mieux dans ces compartiments pourrait avoir un effet bénéfique. L'utilisation par exemple de régimes thérapeutiques incluant la Névirapine est associée à une CV plus faible et à un pourcentage de patients avec une CV indétectable (<1 copie/ml) plus élevé en comparaison notamment à des régimes thérapeutiques incluant soit l'Efavirenz, soit le Lopinavir, ceci étant probablement dû à une excellente diffusion de la Névirapine dans ces compartiments anatomiques [92-94].

➤ Un relargage de virus à partir de réservoirs tels que les LT CD4 infectés mémoires, suite à leur activation antigénique (à l'occasion d'une infection intercurrente ou d'une vaccination par exemple), sans réplication virale persistante associée, ces virus étant incapables de réaliser un nouveau cycle de réplication complet du fait de la pression ARV [95-98].

Il faut souligner que l'origine des virémies de faible niveau peut différer selon qu'il s'agisse de virémies transitoires ou persistantes, ces dernières étant le plus souvent secondaires à un traitement suboptimal.

Si la survenue d'une virémie de faible niveau transitoire (blip) est réputée sans conséquence délétère notamment sur l'évolution virologique et immunologique [27,99,100], les conséquences d'une CVF ne sont pas clairement établies du fait de l'insuffisance de données

dans la littérature, et pourraient avoir un impact délétère notamment sur le plan virologique (accumulation de mutations de résistance et survenue d'un échec virologique ≥ 500 copies/ml), immunologique (reconstitution suboptimale voire détérioration du système immunitaire, activation immune chronique) et clinique. Leur impact dépend vraisemblablement de plusieurs facteurs dont les rôles respectifs ne sont pas déterminés (en particulier le niveau de CV, la durée de détectabilité, le type de traitement ARV et l'histoire thérapeutique).

La prise en charge optimale de ces CVF est par conséquent mal définie. Si la situation de charge virale indétectable reste la situation idéale, on ne peut toutefois pas actuellement affirmer qu'une CVF constitue un échec virologique devant conduire inéluctablement à une modification thérapeutique. Les recommandations américaines concernant la prise en charge des PVVIH ont d'ailleurs modifié leur seuil de l'EV depuis 2011, actuellement défini comme une CV confirmée ≥ 200 copies/ml, en précisant que les données sont actuellement insuffisantes pour établir des recommandations générales concernant la prise en charge des patients présentant une CVF entre 50 et 200 copies/ml [31,101]. Les recommandations nationales définissent quant à elles l'EV comme une CV confirmée ≥ 50 copies/ml, tout en différenciant les réplifications virales faibles ($CV < 200$ copies/ml) des échecs virologiques avérés ($CV > 200$ copies/ml) et en précisant que les conséquences d'une répllication virale faible confirmée entre 50 et 200 copies/ml ne sont pas clairement établies [32]. Il n'existe ainsi en 2015 aucun consensus quant à l'attitude thérapeutique à adopter devant cette situation de $CVF < 200$ copies/ml du fait du manque de données dans la littérature.

De plus amples données sur les conséquences virologiques, immunologiques et cliniques d'une répllication virale de faible niveau persistante sont nécessaires.

B. IMPACT PRONOSTIQUE D'UNE CHARGE VIRALE DE FAIBLE NIVEAU PERSISTANTE SUR L'EVOLUTION CLINIQUE ET VIROLOGIQUE (INTER-COHORTE ART-CC, 1997-2012)

I. Objectif de l'étude

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'impact pronostique d'une charge virale VIH de faible niveau persistante (CVF) sur l'évolution clinique (survenue d'événement classant SIDA et/ou décès) et virologique (risque de survenue d'un échec virologique sous traitement ARV), selon le niveau de la CVF (50-200 ou 200-500 copies/ml), sa durée et le type de schéma thérapeutique antirétroviral (2 inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) + 1 inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse (INNTI) versus 2 INTI + 1 inhibiteur de protéase boosté par du ritonavir (IP/r)).

Cette étude a été réalisée dans le cadre d'une mobilité d'un an à l'Université de Bristol de novembre 2012 à octobre 2013

II. Méthodologie de l'étude :

Population de l'étude :

Une étude de cohorte a été réalisée en utilisant les données de l'intercohorte ART-CC (Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration). Cette intercohorte est une collaboration internationale fondée en 2000 regroupant en 2012 les données de plus de 80000 PVVIH provenant de 18 cohortes d'Europe et d'Amérique du Nord (Etats-Unis et Canada). Les patients inclus dans ART-CC doivent être suivis dans une des 18 cohortes participatives, être âgés de 16 ans ou plus, être infectés par le VIH-1, naïfs de traitement et débiter un premier traitement

comportant aux moins 3 molécules ARV après 1996 (<http://www.bris.ac.uk/art-cc>) [102]. Les données collectées regroupent des données démographiques (notamment âge, sexe, groupe de transmission présumé), cliniques (date et type d'événement clinique classant SIDA, date de décès), biologiques (notamment taux de lymphocytes CD4 et CV VIH), thérapeutiques (traitements ARV). Les cohortes collaboratives ont toutes reçu un avis favorable d'un comité éthique, utilisent des méthodes standardisées pour le recueil des données avec des visites de suivi des patients au minimum tous les 6 mois. La base de données de ART-CC est mise à jour approximativement tous les 2 ans. Cette intercohorte reçoit un financement par le Medical Research Council of the United Kingdom, en association avec les organismes finançant les 18 cohortes.

Les patients de l'étude répondaient aux critères d'inclusion suivants :

- Patients de plus de 18 ans inclus et suivis dans ART-CC entre le 01/01/1997 et le 31/05/2012
- Naïfs de traitement ARV
- Débutant un traitement ARV pendant au moins 6 mois consécutifs comportant 2 INTI (AZT, DDI, D4T, Abacavir, Tenofovir, Emtricitabine, Lamivudine) + 1 INNTI (Efavirenz, Névirapine, Etravirine, Rilpivirine) ou 1 IP/r (Lopinavir, Atazanavir, Darunavir boosté par du ritonavir)
- Ayant une CV < 50 copies/ml après 3 à 9 mois de traitement
- Les techniques virologiques de quantification de la CV VIH utilisées avaient une limite inférieure du seuil de quantification < 50 copies/ml pour l'ensemble des CV mesurées.

Les caractéristiques démographiques, cliniques, biologiques et thérapeutiques des patients ont été extraites de la base de données de l'intercohorte.

Analyses statistiques

La date d'inclusion dans notre étude était la date de la première CV < 50 copies/ml 3-9 mois après le début du traitement ARV.

L'événement d'intérêt principal était la survenue d'un premier événement clinique (EC) après l'inclusion: premier événement clinique classant SIDA (stade C de la classification CDC) ou décès du patient. L'événement d'intérêt secondaire était la survenue d'un premier échec virologique (EV) sous traitement ARV, défini par 2 CV consécutives ≥ 500 copies/ml après l'inclusion, ou une CV ≥ 500 copies/ml avec modification du régime thérapeutique (addition ou suppression d'au moins une classe thérapeutique parmi INTI, INNTI, IP/r, inhibiteur d'intégrase, inhibiteur de fusion, inhibiteur du CCR5, une modification parmi une même classe thérapeutique n'étant pas considérée comme une modification du régime thérapeutique) avant la CV suivante (la date de l'EV étant la date de la première CV ≥ 500 copies/ml).

Les CVF étaient définies par la survenue après l'inclusion d'au moins 2 CV consécutives (mesurées entre 15 jours et 6 mois d'intervalle) comprises entre 50 et 499 copies/ml pendant une durée d'au moins 1 mois (date entre la première et la dernière des CV consécutives comprises entre 50 et 499 copies/ml). Les CVF50-200 étaient définies par au moins 2 CV consécutives entre 50 et 199 copies/ml et les CVF200-500 par au moins 2 CV consécutives entre 50 et 499 copies/ml dont au moins une entre 200 et 499 copies/ml.

Les patients étaient suivis jusqu'à la survenue d'un premier EC ou d'un premier EV. Les patients sans EC ou EV étaient censurés à la date de leur dernière visite de suivi ou à la date de clôture de la base de données (31 mai 2012).

Les patients étaient inclus dans le groupe « CVF50-200 » à partir du début du premier épisode de CVF50-200 et dans le groupe « CVF200-500 » à partir du début du premier épisode de

CVF200-500. Une fois qu'un patient était exposé à la plus haute catégorie de CVF, il restait dans ce groupe jusqu'à la fin du suivi. Trois groupes de patients ont été ainsi constitués :

- Groupe "pas de CVF": patients suivis de l'inclusion jusqu'à la première CVF (50-200 ou 200-500) ou au dernier suivi si jamais exposés à une CVF au cours du suivi
- Groupe "CVF50-200": patients suivis de la date de la première CVF50-200 (survenant avant toute CVF200-500) jusqu'à la date de la première CVF200-500 ou au dernier suivi si jamais exposés à une CVF200-500
- Groupe CVF200-500: patients suivis de la date de la première CVF200-500 jusqu'au dernier suivi.

Les caractéristiques à l'inclusion des 3 groupes de patients (pas de CVF, CVF50-200 et CVF200-500) ont été comparées en utilisant le test de Kruskal-Wallis pour les variables quantitatives et le test du χ^2 pour les variables qualitatives.

Le délai de survenue d'un EC et d'un EV selon l'exposition ou non à une CVF et le niveau de la CVF a été analysé par des courbes de survie selon la méthode de Kaplan-Meier avec utilisation du test de Log-rank pour comparer les 3 groupes.

L'utilisation de modèles de régression de Cox univariés puis multivariés a permis d'estimer l'association entre la survenue d'une CVF (CVF50-200 et CVF200-500 en comparaison au groupe pas de CVF) et la survenue d'un EC et d'un EV. Les modèles ont été ajustés sur l'âge (<30, 30-50 et >50 ans), le sexe, la période d'inclusion (1997-2002, 2003-2006, ≥ 2007), le type de régime thérapeutique (IP/r versus INNTI), le groupe de transmission présumé (hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes (HSH), usager de drogues intraveineuses (UDI), transmission hétérosexuelle, autres), le stade de la classification CDC (stade C versus stade non C), le taux médian de CD4 (0-49, 50-199, 200-349 et ≥ 350 cellules/mm³) et la CV (<4.5, 4.5-4.9 et $\geq 5 \log_{10}$ copies/ml) à l'initiation du traitement ARV. L'hypothèse de proportionnalité des

risques (effet des variables indépendant du temps) a été vérifiée graphiquement et par le test statistique des résidus de Schoenfeld.

Une analyse de sensibilité restreinte aux patients ayant présenté une CVF a été réalisée afin d'étudier l'association entre le type de régime thérapeutique lors de la CVF (IP/r versus INNTI), la modification du régime thérapeutique durant la CVF et sa durée cumulée (<3, 3-6, 6-12 et > 12 mois) avec la survenue d'un EC et d'un EV, ajustée sur les mêmes variables que l'analyse principale.

Une analyse de sensibilité restreinte aux patients n'ayant pas modifié leur traitement durant les épisodes de CVF a été réalisé pour étudier l'impact d'un changement de traitement durant les CVF sur les résultats.

L'ensemble des analyses a été réalisée sur le logiciel Stata (version 12.0, College Station, Texas, USA).

III. Résultats

1. Population de l'étude et caractéristiques des CVF

La sélection des patients inclus est présentée dans la Figure 5 et les caractéristiques des patients inclus dans le Tableau 5.

Parmi les 17902 patients inclus (âge médian de 40 ans, 76% d'hommes, taux médian de lymphocytes CD4 à 226 cellules/mm³, 59% débutant un traitement ARV comportant un INNTI) :

- 624 (3.5%) ont présenté au moins un épisode de CVF50-200 (durée médiane de 5.8 mois [IQR 3.2-8.6], médiane de CV à 89 copies/ml [IQR 72-108])
- 482 (2.7%) ont présenté au moins un épisode de CVF200-500 (durée médiane de 6.4 mois [IQR 3.6-11.2], médiane de CV à 212 copies/ml [IQR 166-259]), dont 93 patients ayant présenté un épisode de CVF50-200 précédant la CVF200-500. Parmi les 482 patients ayant présenté au moins un épisode de CVF200-500, 332 (69%) avaient plus de 50% de leur CV comprises entre 50 et 199 copies/ml durant la CVF200-500.

Le nombre moyen de mesures de CV par année de suivi était similaire dans les 3 groupes (4.22 [IQR: 4.18-4.27] dans le groupe « pas de CVF », 4.42 [4.29-4.56] dans le groupe “CVF50-200” et 4.23 [4.10-4.37] dans le groupe « CVF200-500 »).

Parmi les 624 patients ayant présenté une CVF50-200, 59 (9.5%) ont modifié leur régime thérapeutique (au moins une classe d'ARV) durant la période de CVF (8.9% des patients sous INNTI et 8.3 % des patients sous IP/r, p=0.81). Parmi les 482 patients ayant présenté une CVF200-500, 64 (13.3%) ont modifié leur régime thérapeutique durant la période de CVF (13.7% des patients sous INNTI et 6.4 % des patients sous IP/r, p=0.02).

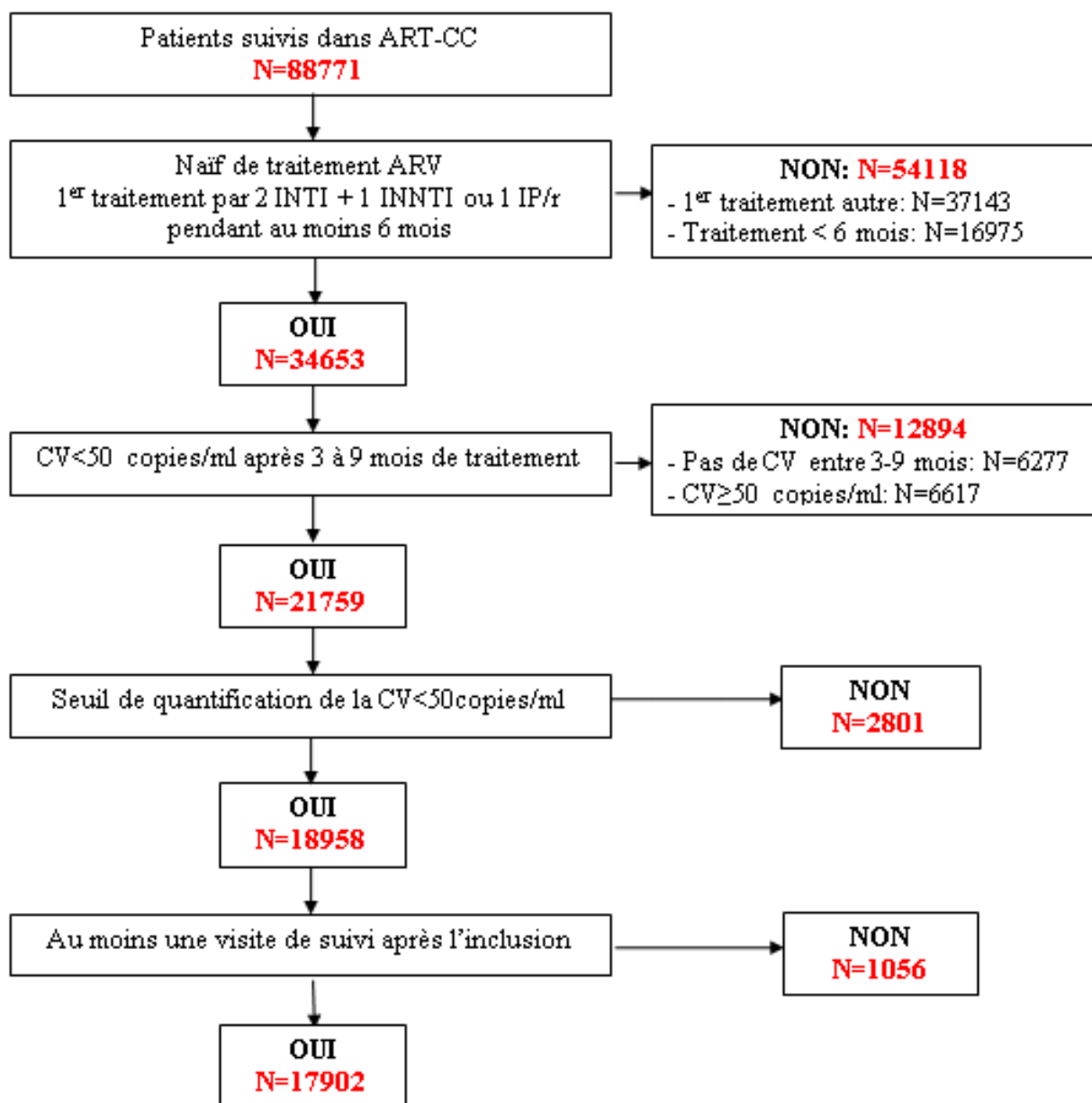
Les patients présentant au moins un épisode de CVF avaient plus tendance à être au stade C, à avoir un taux de CD4 plus bas et une CV plus élevée à l'initiation du traitement et à débiter un régime thérapeutique comportant des IP/r, en comparaison à ceux n'ayant pas présenté de CVF.

Tableau 5: Caractéristiques des patients à l'inclusion (N=17902)

	Pas de CVF n=16796 (93.8%)	CVF50-200 n=624 (3.5%)	CVF200-500 n=482 (2.7%)	p-value
Sexe masculin, n (%)	12678 (75.5%)	514 (82.4%)	353 (73.4%)	<0.001
Age médian, années (IQR)	39 (32-46)	40 (34-49)	39 (32-46)	<0.001
Groupe de transmission, n (%)				<0.001
HSH	7046 (42.0%)	270 (43.3%)	163 (33.9%)	
UDI	1448 (8.6%)	56 (9.0%)	55 (11.4%)	
Hétérosexuelle	6315 (37.6%)	193 (30.9%)	198 (41.2%)	
Autre/inconnu	1988 (11.8%)	105 (16.8%)	65 (13.5%)	
Stade C, n (%)	2808 (16.7%)	140 (22.4%)	124 (25.8%)	<0.001
Taux de CD4, n (%)				<0.001
Médian, cellules/mm ³ (IQR)	230 (132-316)	190 (98-280)	190 (90-287)	
<50 cellules/mm ³	1883 (11.2%)	96 (15.4%)	61 (12.7%)	
50-199 cellules/mm ³	4930 (29.4%)	224 (35.9%)	190 (39.5%)	
200-349 cellules/mm ³	6918 (41.2%)	216 (34.6%)	148 (30.8%)	
≥350 cellules/mm ³	3066 (18.2%)	88 (14.1%)	82 (17.0%)	
CV VIH (log₁₀ cp/ml), n (%)				<0.001
Médiane, log ₁₀ cp/ml (IQR)	4.8 (4.3-5.2)	5.0 (4.7-5.5)	5.0 (4.5-5.4)	
<4.5 log ₁₀	5611 (33.4%)	115 (18.4%)	116 (24.1%)	
4.5-5 log ₁₀	4440 (26.4%)	144 (23.1%)	104 (21.6%)	
>5 log ₁₀	6746 (40.2%)	365 (58.5%)	261 (54.3%)	
Traitement ARV, n (%)				<0.001
2NRTI+1NNRTI	9999 (59.5%)	273 (43.7%)	244 (50.7%)	
2NRTI+1PI/r	6798 (40.5%)	351 (56.3%)	237 (49.3%)	
Période d'inclusion, n (%)				<0.001
1997-2002	2732 (16.2%)	112 (18.0%)	132 (27.4%)	
2003-2006	6799 (40.5%)	291 (46.6%)	244 (50.7%)	
2007-2011	7266 (43.3%)	221 (35.4%)	105 (21.9%)	
Régions, n (%)				<0.001
Europe	14217 (84.6%)	461 (73.9%)	373 (77.6%)	
Canada	1749 (10.4%)	124 (19.9%)	66 (13.7%)	
USA	831 (5.0%)	39 (6.2%)	42 (8.7%)	

CVF : Charge virale de faible niveau persistante, CV : charge virale, IQR: interquartile range, ARV: Antirétroviral, HSH: homme ayant des relations sexuelles avec des hommes, UDI : usager de drogues intraveineuses, INTI : inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse, INNTI : inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse, IP/r: inhibiteur de protéase boosté par du ritonavir

Figure 5 : Sélection des patients inclus – étude ART-CC



2. Evolution clinique: survenue d'un évènement classant SIDA ou d'un décès

Durant 68230 patients-années (PA) avec un suivi médian de 3.1 ans (IQR: 1.6-5.3), 1012 (5.7%) patients ont présenté un évènement clinique (480 décès et 532 évènements cliniques classant SIDA) correspondant à 1.42 (intervalle de confiance IC 95%: 1.33-1.51) évènements cliniques pour 100 PA (1.40 [IC 95%: 1.32-1.50] EC pour 100 PA dans le groupe « pas de CVF », 1.77 [IC 95%: 1.25-2.51] EC pour 100 PA dans le groupe « CVF50-200 » et 1.27 [IC95%: 0.80-2.01] EC pour 100 PA dans le groupe « CVF200-500 »). Le taux de décès était de 0.70 (IC 95%: 0.64-0.77) pour 100 PA et le taux d'évènements classant SIDA de 0.80 (IC 95%: 0.73-0.87) pour 100 PA.

L'analyse de survenue d'un EC par courbes de survie de Kaplan-Meier (selon la survenue d'une CVF et le niveau de la CVF) est présentée Figure 6. Le délai pour que 10% des patients présentent un EC était similaire dans les 3 groupes : 8.6 ans (IC 95%: 7.7-8.9) pour les patients du groupe « pas de CVF », 5.7 ans (IC 95%: 3.8-10) pour les patients du groupe « CVF50-200 » et 8.3 ans (IC 95%: 4.1-10) pour les patients du groupe « CVF200-500» (p=0.229). Aucune différence significative n'était mise en évidence lorsque les analyses étaient restreintes aux décès ou aux évènements classant SIDA respectivement.

Dans les analyses univariées puis multivariées selon le modèle de Cox (Tableau 6), ni la survenue d'une CVF50-200 ni la survenue d'une CVF200-500 n'était associée à la survenue d'un EC (Hazard ratio ajusté HRa: 1.13 [IC 95%: 0.81-1.68] and 0.95 [IC 95%: 0.62-1.48] pour les CVF50-200 et les CVF200-500 respectivement). Aucune association n'était également mise en évidence lorsque les analyses étaient restreintes aux décès (HRa: 1.19 [0.78-1.82] et 1.11 [0.72-1.71] pour les CVF50-200 et les CVF200-500 respectivement) ou aux évènements classant SIDA (HRa: 1.11 [0.79-1.61] et 0.81 [0.51-1.28] pour les CVF50-200 et les CVF200-500 respectivement).

Le taux de lymphocytes CD4, le stade C, l'âge, le groupe de transmission à l'inclusion et la période d'inclusion étaient fortement associés à la survenue d'un EC (Tableau 6).

Dans l'analyse de sensibilité restreinte aux patients ayant présenté une CVF, ni le niveau de la CVF, ni le type de traitement ARV à la CVF (IP/r versus INNTI), ni la modification du régime thérapeutique durant la CVF ni la durée cumulée de la CVF (<3, 3-6, 6-12, >12 mois) n'étaient associés à la survenue d'un EC (Tableau 7).

Figure 6: Incidence cumulée des évènements cliniques (évènements classant SIDA/décès) selon la survenue d'une CVF et le niveau de la CVF - Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration 1997-2011

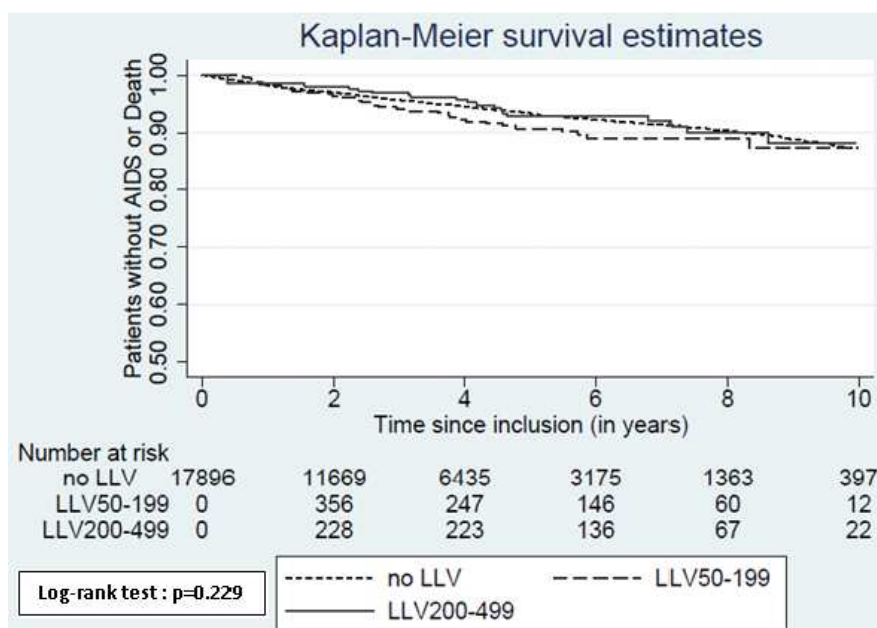


Tableau 6: Analyses univariées et multivariées selon le modèle de Cox de la survenue d'un évènement clinique (évènement classant SIDA/décès) selon la survenue d'une CVF (Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration 1997-2011)

Caractéristiques	HR (IC 95%)	p-value	HR ajusté (IC 95%)	p-value
CVF		0.263		0.391
- Pas de CVF	1		1	
- CVF50-200	1.30 (0.90-1.80)		1.13 (0.81-1.68)	
- CVF200-500	1.07 (0.72-1.58)		0.95 (0.62-1.48)	
Traitement ARV à l'inclusion		0.138		0.593
- 2INTI+1INNTI	1		1	
- 2INTI+1IP/r	1.15 (0.96-1.39)		1.06 (0.86-1.30)	
CV à l'initiation des ARV		0.035		0.637
- <4.5 log10 copies/ml	1		1	
- 4.5-5 log10 copies/ml	1.02 (0.86-1.33)		0.92 (0.77-1.10)	
- >5 log10 copies/ml	1.19 (1.03-1.39)		0.94 (0.80-1.11)	
Taux de CD4 à l'initiation des ARV		<0.001		<0.001
- <50 cellules/mm ³	1		1	
- 50-199 cellules/mm ³	0.83 (0.65-1.07)		1.09 (0.89-1.32)	
- 200-349 cellules/mm ³	0.53 (0.40-0.69)		0.81 (0.64-1.00)	
- ≥350 cellules/mm ³	0.50 (0.36-0.69)		0.76 (0.58-0.99)	
Stade C à l'inclusion (Oui vs Non)	2.00 (1.64-2.42)	<0.001	1.68 (1.43-1.97)	<0.001
Age à l'inclusion (années)		<0.001		<0.001
- <30	1		1	
- 30-50	1.44 (1.16-1.78)		1.29 (1.03-1.60)	
- >50	2.43 (1.92-3.08)		2.17 (1.70-2.76)	
Sexe (féminin vs masculin)	0.97 (0.84-1.13)	0.728	0.97 (0.81-1.15)	0.728
Groupe de transmission		<0.001		<0.001
- HSH	1		1	
- UDI	2.39 (2.80-4.53)		2.22 (1.80-2.74)	
- Hétérosexuelle	1.21 (0.75-1.20)		1.16 (0.97-1.39)	
- Autre/inconnu	1.49 (1.44-2.47)		1.32 (1.06-1.65)	
Période d'inclusion		0.001		0.008
- 2007-2011	1		1	
- 2003-2006	1.27 (1.06-1.53)		1.26 (1.05-1.52)	
- 1997-2002	1.44 (1.17-1.53)		1.61 (1.30-2.00)	

Ajusté sur les variables du tableau et stratifié par cohorte.

CVF : Charge virale de faible niveau persistante, IC : intervalle de confiance, HR : hazard ratio, CV : charge virale, ARV : Antirétroviral, HSH: homme ayant des relations sexuelles avec des hommes, UDI : usager de drogues intraveineuses, INTI : inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse, INNTI : inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse, IP/r: inhibiteur de protéase boosté par du ritonavir

Tableau 7: Analyses univariées et multivariées selon le modèle de Cox de la survenue d'un évènement clinique (évènement classant SIDA/décès) parmi les patients exposés à un épisode de CVF (N=1106, Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration 1997-2011)

Caractéristiques	HR (IC 95%)	p-value	HR ajusté (IC 95%)	p-value
CVF		0.455		0.730
- CVF50-200	1		1	
- CVF200-500	0.80 (0.44-1.43)		0.87 (0.51-1.55)	
Durée de la CVF		0.724		0.591
- <3 mois	1		1	
- 3-6 mois	0.63 (0.28-1.41)		0.73 (0.31-1.73)	
- 6-12 mois	0.85 (0.41-1.76)		0.99 (0.43-2.28)	
- >12 mois	0.81 (0.33-1.99)		0.89 (0.30-2.61)	
Traitement ARV au début de la CVF		0.325		0.638
- 2INTI+1INNTI	1		1	
- 2INTI+1IP/r	0.77 (0.49-1.38)		0.85 (0.51-1.47)	
Modification du régime ARV lors de la CVF		0.919		0.779
- Non	1		1	
- Oui	1.04 (0.45-2.45)		1.13 (0.46-2.79)	

Stratifié par cohorte et ajusté sur les variables du tableau et l'âge, le sexe, le taux de CD4 et la CV à l'initiation du traitement, le stade C à l'inclusion, le groupe de transmission et la période d'inclusion

CVF : Charge virale de faible niveau persistante, IC : intervalle de confiance, HR : hazard ratio, ARV: Antirétroviral, INTI : inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse, INNTI : inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse, IP/r: inhibiteur de protéase boosté par du ritonavir

3. Evolution virologique : survenue d'un EV \geq 500 copies/ml

Durant 54641 PA avec un suivi médian de 2.3 ans (IQR : 1.0-4.3) :

- 1745 patients (10.4%) ont présenté un échec virologique (EV) parmi les 16796 du groupe « pas de CVF », correspondant à 3.3 (IC95%: 3.2-3.5) EV pour 100PA
- 49 patients (7.9%) ont présenté un EV parmi les 624 du groupe « CVF50-200 », correspondant à 3.2 (2.4-4.2) EV pour 100PA (3.8 [2.6-5.5] EV pour 100PA pour les patients sous INNTI et 2.8 [1.8-4.2] EV pour 100PA pour les patients sous IP/r lors de la CVF50-200).
- 109 patients (22.6%) ont présenté un EV parmi les 482 du groupe « CVF200-500 », correspondant à 11.6 (9.7-14.1) EV pour 100PA (11.9 [9.2-15.3] EV pour 100PA pour les patients sous INNTI et 11.4 [8.6-15.0] EV pour 100PA pour les patients sous IP/r lors de la CVF200-500).

Parmi les 1903 patients présentant un EV, 961 (50.5%) ont modifié leur régime thérapeutique (au moins une classe thérapeutique) dans les 6 mois suivant l'EV. Parmi les patients ayant modifié leur traitement ARV, 77.2% avaient une CV < 50 copies/ml dans les 6 mois suivant la modification thérapeutique et 81.9% dans les 12 mois. Parmi les patients n'ayant pas modifié leur traitement après l'EV, 14.1% avaient une CV < 50 copies/ml dans les 6 mois suivant l'EV et 26.4% dans les 12 mois.

L'analyse de survenue d'un EV par courbes de survie de Kaplan-Meier (selon la survenue d'une CVF et le niveau de la CVF) est présentée Figure 7. Le délai pour que 10% des patients présentent un EV était de 2.8 ans (IC 95%: 2.6-3.0) pour les patients du groupe « pas de CVF », de 2.2 ans (1.1-3.5) pour les patients du groupe « CVF50-200 » ($p=0.160$ en comparaison au groupe « pas de CVF ») et de 1.1 ans (0.3-1.9) pour les patients du groupe « CVF200-500 » ($p<0.001$ en comparaison au groupe « pas de CVF »).

Dans les analyses univariées puis multivariées selon le modèle de Cox (Tableau 8), la survenue d'une CVF200-500 était fortement associée à la survenue d'un EV (HRa: 3.97, IC 95%: 3.05-5.17). A l'opposé, la survenue d'une CVF50-200 n'était pas associée significativement à la survenue d'un EV (HRa: 1.38, IC 95%: 0.96-2.00). Le type de régime thérapeutique à l'inclusion n'était pas associé significativement à la survenue d'un EV (HRa pour IP/r versus NNRTI: 1.14, IC 95: 0.99-1.31). L'âge, le stade C, le groupe de transmission et la période d'inclusion étaient fortement associés à la survenue d'un EV.

Dans l'analyse de sensibilité restreinte aux patients ayant présenté une CVF, ni le type de régime thérapeutique lors de la CVF (IP/r versus INNTI), ni la modification du régime thérapeutique durant la CVF ni la durée cumulée de la CVF (<3, 3-6, 6-12, >12 mois) n'étaient associés à la survenue d'un EV (Tableau 9).

Dans l'analyse de sensibilité restreinte aux patients n'ayant pas modifié leur traitement durant la CVF parmi les patients recevant un régime thérapeutique comportant un IP/r ou un INNTI, la survenue d'une CVF200-500 était toujours fortement associée à la survenue d'un EV (HRa: 4.39, IC 95%: 2.90-6.63 sous IP/r et HRa: 3.51, IC 95%: 2.31-5.34 sous INNTI). La survenue d'une CVF50-200 restait non associée significativement à la survenue d'un EV (HRa: 0.91, IC 95%: 0.46-1.78 sous IP/r et HRa: 1.59, IC 95%: 0.93-2.74 sous INNTI).

Cette étude a été l'objet d'une communication affichée à la CROI 2014 puis publiée dans la revue AIDS en janvier 2015.

Impact of low-level viremia on clinical and virological outcomes in treated HIV-1 Infected Patients. AIDS. 2015 Jan 28;29(3):373-83

M-A. Vandenhende, S.Ingle, M. May, G. Chêne, R. Zangerle, A. van Sighem, M.J. Gill, C. Schwarze-Zander, B. Hernández-Novoa, N. Obel, O. Kirk, S. Abgrall, J. Guest, H. Samji, A. d'Arminio Monforte, J.M Llibre, C. Smith, M. Cavassini, G.A. Burkholder, B. Shepherd, H.M. Crane, J. Sterne and P. Morlat on behalf of the Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration (ART-CC).

Figure 7: Incidence cumulée des échecs virologiques selon la survenue d'une CVF et le niveau de la CVF - Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration 1997-2011

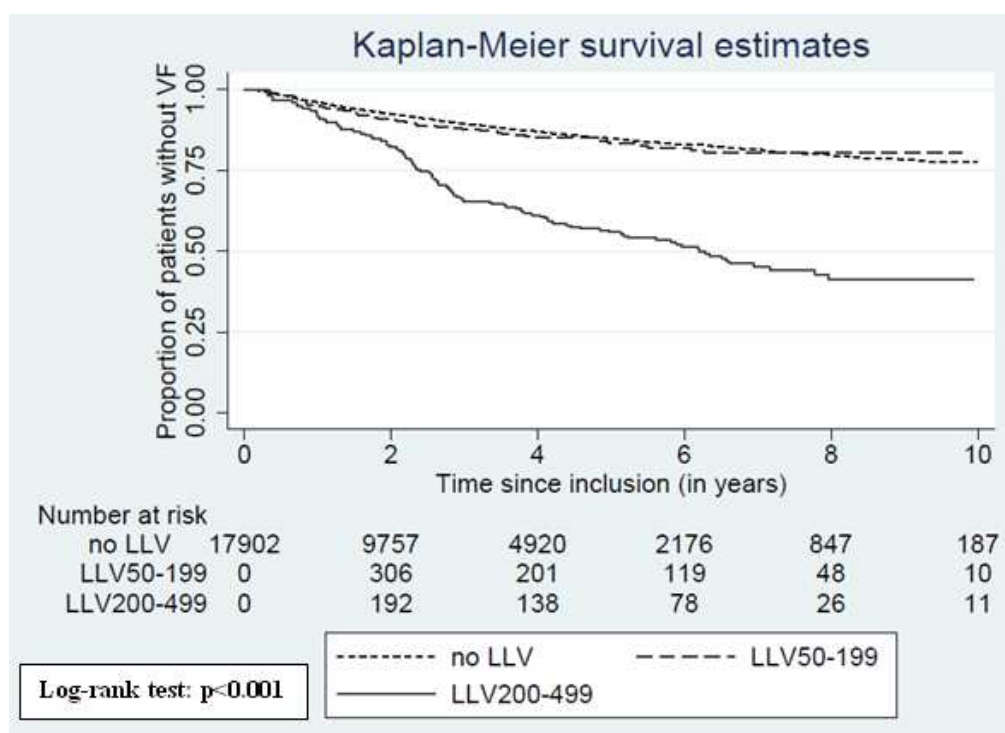


Tableau 8: Analyses univariées et multivariées selon le modèle de Cox de la survenue d'un échec virologique (2 CV \geq 500 copies/ml) selon la survenue d'une CVF (Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration 1997-2011)

Caractéristiques	HR (IC 95%)	p-value	HR ajusté (IC 95%)	p-value
CVF		<0.001		<0.001
- Pas de CVF	1		1	
- CVF50-200	1.32 (0.92-1.90)		1.38 (0.96-2.00)	
- CVF200-500	4.94 (3.82-6.38)		3.97 (3.05-5.17)	
Traitement ARV à l'inclusion		0.260		0.063
- 2INTI+1INNTI	1		1	
- 2INTI+1IP/r	1.07 (0.95-1.22)		1.14 (0.99-1.31)	
CV à l'initiation des ARV		0.284		0.999
- <4.5 log10 copies/ml	1		1	
- 4.5-5 log10 copies/ml	0.90 (0.76-1.06)		1.00 (0.85-1.18)	
- >5 log10 copies/ml	0.90 (0.78-1.04)		1.00 (0.86-1.17)	
Taux de CD4 à l'initiation des ARV		<0.001		0.080
- <50 cellules/mm ³	1		1	
- 50-199 cellules/mm ³	0.77 (0.63-0.93)		0.89 (0.72-1.09)	
- 200-349 cellules/mm ³	0.63 (0.52-0.77)		0.82 (0.66-1.02)	
- \geq 350 cellules/mm ³	0.93 (0.77-1.22)		1.19 (0.92-1.54)	
Stade C à l'inclusion (Oui vs Non)	1.27 (1.10-1.47)	0.002	1.20 (1.02-1.42)	0.032
Age à l'inclusion (années)		<0.001		<0.001
- >50	1		1	
- 30-50	1.30 (1.08-1.58)		1.30 (1.07-1.58)	
- <30	2.17 (1.75-2.70)		2.00 (1.60-2.49)	
Sexe (féminin vs masculin)	1.58 (1.39-1.80)	<0.001	1.14 (0.97-1.33)	0.107
Groupe de transmission		<0.001		<0.001
- HSH	1		1	
- UDI	2.04 (1.65-2.52)		1.75 (1.39-2.20)	
- Hétérosexuelle	1.85 (1.60-2.13)		1.48 (1.24-1.77)	
- Autre/inconnu	1.42 (1.15-1.76)		1.24 (0.98-1.56)	
Période d'inclusion		<0.001		<0.001
- 2007-2011	1		1	
- 2003-2006	2.11 (1.73-2.57)		1.93 (1.57-2.36)	
- 1997-2002	3.73 (3.03-4.58)		3.22 (2.58-4.02)	

Ajusté sur les variables du tableau et stratifié par cohorte

CVF : Charge virale de faible niveau persistante, IC : intervalle de confiance, HR : hazard ratio, CV : charge virale, ARV : Antirétroviral, HSH: homme ayant des relations sexuelles avec des hommes, UDI : usager de drogues intraveineuses, INTI : inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse, INNTI : inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse, IP/r: inhibiteur de protéase boosté par du ritonavir

Tableau 9: Analyses univariées et multivariées selon le modèle de Cox de la survenue d'un échec virologique parmi les patients exposés à un épisode de CVF (N=1106, Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration 1997-2011)

Caractéristiques	HR (IC 95%)	p-value	HR ajusté (IC 95%)	p-value
CVF		<0.001		<0.001
- CVF50-200	1		1	
- CVF200-500	4.07 (2.64-6.28)		3.35 (2.14-5.26)	
Durée de la CVF		0.459		0.985
- <3 mois	1		1	
- 3-6 mois	1.32 (0.71-2.45)		0.95 (0.49-1.81)	
- 6-12 mois	1.30 (0.70-2.41)		0.89 (0.46-1.70)	
- >12 mois	1.75 (0.88-3.48)		0.90 (0.42-1.92)	
Traitement ARV au début de la CVF		0.247		0.925
- 2INTI+1INNTI	1		1	
- 2INTI+1IP/r	0.79 (0.52-1.18)		1.02 (0.62-1.68)	
Modification du régime ARV lors de la CVF		0.018		0.180
- Non	1		1	
- Oui	1.86 (1.11-3.11)		1.45 (0.84-2.49)	

Stratifié par cohorte et ajusté sur les variables du tableau et l'âge, le sexe, le taux de CD4 et la CV à l'initiation du traitement, le stade C à l'inclusion, le groupe de transmission et la période d'inclusion

CVF : Charge virale de faible niveau persistante, IC : intervalle de confiance, HR : hazard ratio, ARV: Antirétroviral, INTI : inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse, INNTI : inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse, IP/r: inhibiteur de protéase boosté par du ritonavir

Impact of low-level viremia on clinical and virological outcomes in treated HIV-1-infected patients

The Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration (ART-CC)*

Background: The goal of antiretroviral therapy (ART) is to reduce HIV-related morbidity and mortality by suppressing HIV replication. The prognostic value of persistent low-level viremia (LLV), particularly for clinical outcomes, is unknown.

Objective: Assess the association of different levels of LLV with virological failure, AIDS event, and death among HIV-infected patients receiving combination ART.

Methods: We analyzed data from 18 cohorts in Europe and North America, contributing to the ART Cohort Collaboration. Eligible patients achieved viral load below 50 copies/ml within 3–9 months after ART initiation. LLV50–199 was defined as two consecutive viral loads between 50 and 199 copies/ml and LLV200–499 as two consecutive viral loads between 50 and 499 copies/ml, with at least one between 200 and 499 copies/ml. We used Cox models to estimate the association of LLV with virological failure (two consecutive viral loads at least 500 copies/ml or one viral load at least 500 copies/ml, followed by a modification of ART) and AIDS event/death.

Results: Among 17 902 patients, 624 (3.5%) experienced LLV50–199 and 482 (2.7%) LLV200–499. Median follow-up was 2.3 and 3.1 years for virological and clinical outcomes, respectively. There were 1903 virological failure, 532 AIDS events and 480 deaths. LLV200–499 was strongly associated with virological failure [adjusted hazard ratio (aHR) 3.97, 95% confidence interval (CI) 3.05–5.17]. LLV50–199 was weakly associated with virological failure (aHR 1.38, 95% CI 0.96–2.00). LLV50–199 and LLV200–499 were not associated with AIDS event/death (aHR 1.19, 95% CI 0.78–1.82; and aHR 1.11, 95% CI 0.72–1.71, respectively).

Conclusion: LLV200–499 was strongly associated with virological failure, but not with AIDS event/death. Our results support the US guidelines, which define virological failure as a confirmed viral load above 200 copies/ml.

Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

AIDS 2015, **29**:373–383

Keywords: AIDS event, death, HIV, low-level viremia, virological failure

Introduction

Combination antiretroviral therapy (ART) has dramatically reduced HIV-related morbidity and mortality [1] through its ability to suppress HIV replication. HIV viremia strongly predicts progression to AIDS and death [2]. According to current international treatment guidelines, the goal of ART is therefore to reach and to maintain undetectable plasma HIV viral load [3,4]. In recent years, the improvement of assays quantifying plasma viral load has progressively led to decreasing the

thresholds for detecting viremia, currently between 20 and 50 copies/ml in clinical practice. Around 20% of HIV-infected patients receiving combination ART show transient rebounds of viremia, and 4–10% experience persistent episodes of detectable viremia at low levels, between 50 and 500 copies/ml [5–8].

There is no evidence that transient rebounds of viremia ('blips', usually defined as detectable viremia up to a maximum of 500 copies/ml preceded and followed by visits showing undetectable viremia) are associated with

Correspondence to Marie-Anne Vandenhende, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Hôpital Saint-André, Service de médecine interne et maladies infectieuses, F-33000 Bordeaux, France.

Tel: +33 556795826; fax: +33 556795822; e-mail: vdh.mav@gmail.com

* The members of the writing committee and 'The Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration (ART-CC)' contributing cohorts are given in the 'Acknowledgements' section along with their institute details.

Received: 1 August 2014; revised: 4 November 2014; accepted: 6 November 2014.

DOI:10.1097/QAD.0000000000000544

subsequent virological or immunological failure [8–10]. By contrast, persistent low-level viremia (LLV) might be associated with negative consequences such as virological failure [6,10–13], emergence of drug resistance [7,14–18], and immunological deterioration [19]. The optimal management of patients experiencing LLV is still unclear due to the lack of controlled comparison data, especially in the range of 50–200 copies/ml, and the impact of LLV on clinical outcomes remains unknown. Although achieving an undetectable viral load remains the goal of ART, we cannot assert that LLV must be considered as virological failure requiring treatment modification or more frequent virological monitoring. The Department of Health and Human Services (DHHS, USA) guidelines currently define virological failure as a confirmed viral load above 200 copies/ml [20], but there are currently no international guidelines on how to manage patients experiencing LLV and further studies are assuredly needed to establish the effect of LLV on HIV prognosis.

We aimed to assess the prognostic impact of different levels of LLV (50–199 and 200–499 copies/ml) on clinical (AIDS events and death) and virological outcomes (virological failure) among HIV-infected patients receiving potent combination ART.

Methods

Study population

We analyzed data from 18 cohorts in Europe and North America, contributing to the ART Cohort Collaboration (ART-CC) [21] (<http://www.bris.ac.uk/art-cc>). Briefly, ART-CC includes patients with confirmed HIV infection, aged at least 16 years, who started combination ART after 1996 without previous treatment with antiretroviral drugs. Contributing cohorts (listed in the ‘Acknowledgements’ section) have received approval from the ethics committees or institutional review boards, used standardized methods of data collection, and scheduled follow-up visits at least every 6 months. The NHS Health Research Authority South West – Cornwall and Plymouth Research Ethics Committee, UK, has approved the ART-CC study (REC reference 12/SW/0253).

Patients were eligible for inclusion in the current analysis if they: started (‘baseline’) an ART regimen composed of two nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs, among zidovudine, didanosine, stavudine, abacavir, tenofovir, emtricitabine, and lamivudine) with either a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI, among efavirenz, nevirapine, etravirine, and rilpivirine) or a protease inhibitor-boosted with ritonavir (PI/r, among atazanavir, darunavir, and lopinavir), which was continued for at least 6 months; achieved viral load below 50 copies/ml within 3–9 months after ART initiation (virological suppression); and all viral loads were measured by virological assays with lower limit of

quantification 50 copies/ml or less. Demographic, clinical, and biological characteristics, and ART regimen of eligible participants were extracted from the cohort database, which was compiled in 2012.

Statistical analysis

Low-level viremia 50–199 was defined as at least two consecutive viral loads between 50 and 199 copies/ml for at least 1 month, and LLV200–499 as at least two consecutive viral loads between 50 and 499 copies/ml for at least 1 month, with at least one viral load between 200 and 499 copies/ml, after virological suppression. The primary outcome was occurrence of clinical events (first AIDS event after ART initiation, defined as a clinical event listed in category C, according to the classification of the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) for HIV infection as revised in 1993 [22], and death). The secondary outcome was occurrence of a first virological failure, defined as at least two consecutive viral loads at least 500 copies/ml or one viral load at least 500 copies/ml, followed by a modification of at least one therapeutic class in ART regimen. The date of virological failure was the date of the first of these viral loads at least 500 copies/ml. Baseline characteristics of patients experiencing LLV (LLV50–199 and LLV200–499) were compared with those of patients who did not experience LLV (group ‘no LLV’) using Kruskal–Wallis tests for continuous variables and chi-square tests for categorical variables.

Follow-up started at the date of the first viral load below 50 copies/ml, within 3–9 months after ART initiation. Patients without virological failure or clinical events were right-censored at the date of the last follow-up visit. LLV was analyzed as a time-varying covariate in which patients were included in the LLV50–199-exposed group from the first date they experienced an episode of LLV50–199, and in the LLV200–499-exposed group from the first date they experienced an episode of LLV200–499. Once patients were exposed to a higher category of LLV, they remained in this category for the remaining follow-up time. Thus, there were three groups: no LLV: time from start of follow-up to first LLV50–199/LLV200–499; LLV50–199: time from first LLV50–199 (before first LLV200–499) to date of first LLV200–499; and LLV200–499: time from first LLV200–499.

Extended Kaplan–Meier curves (as described here: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1198/000313005X70371>) were used to examine the distributions of time to virological failure and clinical events by LLV group, and comparisons between them were made using log-rank test. We used Cox proportional-hazards regression models stratified by cohort to estimate crude and adjusted hazard ratios for associations of LLV (50–199 and 200–499 copies/ml, compared to <50 copies/ml), with first virological failure and first AIDS event/death. Models were adjusted for sex; baseline age (<30, 30–49 and ≥50 years); ART regimen (NNRTI or PI/r-based

regimen); transmission group [MSM, injection drug user (IDU), heterosexual, other/unknown]; CD4⁺ cell count (0–49, 50–199, 200–349, ≥350 cells/μl); viral load (<4.5 log, 4.5–4.9 log, ≥5 log copies/ml); AIDS stage; and period of ART initiation (1997–2002, 2003–2006, ≥2007). The proportional hazards assumption was checked graphically and by tests based on Schoenfeld residuals. Cox models restricted to patients experiencing LLV were used to estimate the association of cumulative duration of LLV (1–3, 3–6, 6–12, and >12 months) and type of ART regimen at LLV (NNRTI or PI/r-based regimen) with first virological failure and first AIDS event/death, adjusted for same variables. Cox models restricted to patients who did not modify their ART regimen during LLV were performed to assess the impact of switching antiretroviral drugs during LLV on the outcomes. All statistical analyses were performed using Stata software (version 12.0; College Station, Texas, USA).

Results

Among the 17 902 included patients (median age 39.6 years, 76% men, median baseline CD4⁺ 229 cells/μl, 59% starting NNRTI-based regimens), 624 (3.5%) experienced

at least one episode of LLV50–199 with no LLV200–499 [median duration 5.8, interquartile range (IQR) 3.2–8.6 months] and 482 (2.7%) at least one episode of LLV200–499 (median duration 6.4, IQR, 3.6–11.2 months). The mean number of viral load measures per year of follow-up was similar in the three groups [4.22, 95% confidence interval (CI) 4.18–4.27 in the no LLV group; 4.42, 95% CI 4.29–4.56 in the LLV50–199 group; and 4.23, 95% CI 4.10–4.37 in the LLV200–499 group]. Among the 624 patients who experienced at least one episode of LLV50–199, 59 (9.5%) modified their ART regimen (at least one class of antiretroviral drugs) during LLV (8.9 and 8.3% among patients receiving NNRTI and PI/r-based regimen, respectively). Among the 482 patients who experienced at least one episode of LLV200–499, 64 (13.3%) modified their ART regimen during LLV (13.7 and 6.4% among patients receiving NNRTI and PI/r-based regimen, respectively). Baseline characteristics of the included patients according to the occurrence of LLV50–199 or LLV200–499 are described in Table 1. Patients who experienced LLV were more likely to have had an AIDS event (CDC stage C) before starting ART, had lower CD4⁺ cell counts and higher viral load at start of ART, were more likely to start with a

Table 1. Baseline characteristics of included patients (N = 17 902).

	No LLV (n = 16 796) (93.8%)	LLV50–199 (n = 624) (3.5%)	LLV200–499 (n = 482) (2.7%)	P value
Sex male [n (%)]	12678 (75.5%)	514 (82.4%)	353 (73.4%)	<0.001
Median age [years (IQR)]	39 (32;46)	40 (34;49)	39 (32;46)	<0.001
Transmission group [n (%)]				<0.001
MSM	7046 (42.0%)	270 (43.3%)	163 (33.9%)	
IDU	1448 (8.6%)	56 (9.0%)	55 (11.4%)	
Heterosexual	6315 (37.6%)	193 (30.9%)	198 (41.2%)	
Other/unknown	1988 (11.8%)	105 (16.8%)	65 (13.5%)	
CDC stage C [n (%)]	2808 (16.7%)	140 (22.4%)	124 (25.8%)	<0.001
CD4 ⁺ cell count [n (%)]				<0.001
Median [cells/μl (IQR)]	230 (132–316)	190 (98–280)	190 (90–287)	
<50 cells/μl	1883 (11.2%)	96 (15.4%)	61 (12.7%)	
50–199 cells/μl	4930 (29.4%)	224 (35.9%)	190 (39.5%)	
200–349 cells/μl	6918 (41.2%)	216 (34.6%)	148 (30.8%)	
≥350 cells/μl	3066 (18.2%)	88 (14.1%)	82 (17.0%)	
HIV-1 VL (log ₁₀ copies/ml) [n (%)]				<0.001
Median [log ₁₀ copies/ml (IQR)]	4.8 (4.3–5.2)	5.0 (4.7–5.5)	5.0 (4.5–5.4)	
<4.5 log	5611 (33.4%)	115 (18.4%)	116 (24.1%)	
4.5–5 log	4440 (26.4%)	144 (23.1%)	104 (21.6%)	
>5 log	6746 (40.2%)	365 (58.5%)	261 (54.3%)	
ART regimen [n (%)]				<0.001
2 NRTI + 1 NNRTI	9999 (59.5%)	273 (43.7%)	244 (50.7%)	
2 NRTI + 1 PI/r	6798 (40.5%)	351 (56.3%)	237 (49.3%)	
Date of inclusion [n (%)]				<0.001
1997–2002	2732 (16.2%)	112 (18.0%)	132 (27.4%)	
2003–2006	6799 (40.5%)	291 (46.6%)	244 (50.7%)	
2007–2011	7266 (43.3%)	221 (35.4%)	105 (21.9%)	
Region [n (%)]				<0.001
Europe	14217 (84.6%)	461 (73.9%)	373 (77.6%)	
Canada	1749 (10.4%)	124 (19.9%)	66 (13.7%)	
USA	831 (5.0%)	39 (6.2%)	42 (8.7%)	

No LLV: neither LLV50–199 nor LLV 200–499 (N = 16 796); LLV50–199: at least one episode of LLV50–199 without LLV200–499 (N = 624); LLV200–499: at least one episode of LLV200–499 (N = 482) (included 93 patients with LLV50–199 before LLV200–499). ART, antiretroviral therapy; IDU, injection drug user; IQR, interquartile range; LLV, low-level viremia; NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitor; PI/r, protease inhibitor-boosted with ritonavir; VL, viral load.

PI/r-containing ART regimen, and tended to start ART less recently than those who did not experience LLV.

Virological outcome

During 54 641 person-years of follow-up (PYFU) (median 2.3 years, IQR 1.0–4.3), 1903 patients (10.6%) experienced virological failure [1745 (10.4%) among 16 796 patients without LLV, 49 (7.9%) among 624 patients experiencing LLV50–199, and 109 (22.6%) among 482 patients experiencing LLV200–499], corresponding to 3.48 virological failure per 100 PYFU (95% CI 3.33–3.64).

Among the 1903 patients experiencing virological failure, 961 (50.5%) modified their ART regimen (at least one therapeutic class) within 6 months after virological failure.

Among the patients who modified their ART regimen, 77.2% had viral load below 50 copies/ml within 6 months after ART modification and 81.9% within 12 months after ART modification, whereas among the patients who stayed under the same ART regimen, 14.1% had viral load below 50 copies/ml within 6 months after virological failure and 26.4% within 12 months after virological failure.

On the basis of the Kaplan–Meier estimates, the time by which 90% of patients remained free of virological failure (virological failure 90% survival time) was 2.7 (95% CI 2.5–2.8) years (Fig. 1a). The virological failure 90% survival time was 2.8 (95% CI 2.6–3.0) years for patients without LLV, 2.2 (1.1–3.5) years for patients with LLV50–199 ($P = 0.160$ compared with patients without

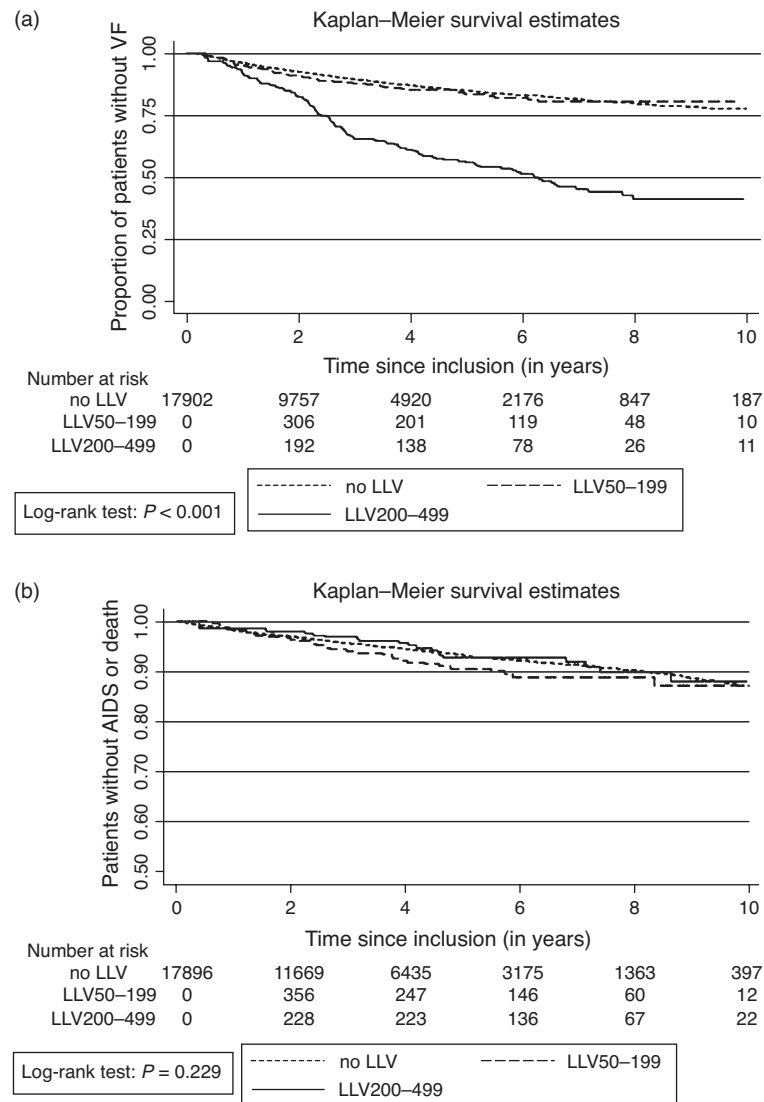


Fig. 1. Incidence of virological failure and AIDS event/death according to the presence and degree of low-level viremia in an international cohort collaboration (Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration 1997–2011). (a) Incidence of VF according to the presence and degree of low-level viremia. (b) Incidence of AIDS event/death according to the presence and degree of low-level viremia. VF, virological failure.

LLV), and 1.1 (0.3–1.9) years for patients with LLV200–499 ($P < 0.001$ compared with patients without LLV).

Both before and after adjusting for patient characteristics at start of ART, LLV200–499 was strongly associated with virological failure [adjusted hazard ratio (aHR) 3.97, 95% CI 3.05–5.17]. By contrast, LLV50–199 was weakly associated with virological failure (aHR 1.38, 95% CI 0.96–2.00). We found weak evidence of association between ART regimen at inclusion and risk of virological failure (aHR for PI/r-based versus NNRTI-based regimen 1.14, 95% CI 0.99–1.31). Baseline AIDS stage, CD4⁺ cell count, age, transmission group, and period of ART initiation were strongly associated with virological failure (Table 2). In sensitivity analyses restricted to patients experiencing LLV, neither type of ART regimen at LLV (PI/r-based versus NNRTI-based regimen), modification of ART regimen during LLV (at least one class of antiretroviral drug), nor cumulative duration of LLV was associated with virological failure (Table 3). In sensitivity analyses restricted to patients who did not modify their ART regimen during LLV among both patients receiving PI/r and NNRTI, LLV200–499 was still strongly associated with virological failure (aHR 4.39, 95% CI 2.90–6.63 for PI/r; and aHR 3.51, 95% CI 2.31–5.34 for NNRTI), whereas LLV50–199 was not

(aHR 0.91, 95% CI 0.46–1.78; and aHR 1.59, 95% CI 0.93–2.74 for PI/r and NNRTI, respectively).

Clinical outcomes

During 68 230 PYFU (median 3.1 years, IQR 1.6–5.3), 480 (2.7%) patients died [432 (2.6%) among 16 796 patients without LLV, 24 (3.8%) among 624 patients experiencing LLV50–199, and 24 (5.0%) among 482 patients experiencing LLV200–499], corresponding to 0.70 (95% CI 0.64–0.77) deaths per 100 PYFU with a 95% survival time of 7.1 (6.4–7.9) years. Furthermore, 532 (3.0%) patients experienced at least one post-ART AIDS event, corresponding to 0.80 (0.73–0.87) AIDS events per 100 PYFU, with a 95% survival time to AIDS event of 8.1 (7.3–9.1) years.

On the basis of Kaplan–Meier estimates, the time by which 90% of patients remained free of clinical events (AIDS event/death) (Fig. 1b) was not different between the three groups, as this time was 8.6 (95% CI 7.7–8.9) years for patients without LLV, 5.7 (3.8–10) years for patients with LLV50–199, and 8.3 (4.1–10) years for patients with LLV200–499 ($P = 0.229$). No difference was found when these analyses were restricted to either AIDS event or death, respectively (data not shown).

Table 2. Crude and adjusted hazard ratios for virological failure, stratified by cohort (N = 17 902).

Risk factor	Crude HR (95% CI)	P value	Adjusted HR (95% CI)	P value
LLV		<0.001		<0.001
No LLV	1		1	
LLV50–200	1.32 (0.92–1.90)		1.38 (0.96–2.00)	
LLV200–500	4.94 (3.82–6.38)		3.97 (3.05–5.17)	
ART at inclusion		0.260		0.063
2 NRTI + 1 NNRTI	1		1	
2 NRTI + 1 PI/r	1.07 (0.95–1.22)		1.14 (0.99–1.31)	
VL before ART (log ₁₀ copies/ml)		0.284		0.999
<4.5	1		1	
4.5–5	0.90 (0.76–1.06)		1.00 (0.85–1.18)	
>5	0.90 (0.78–1.04)		1.00 (0.86–1.17)	
CD4 ⁺ cell count before ART		<0.001		0.008
<50 cells/μl	1		1	
50–199 cells/μl	0.77 (0.63–0.93)		0.89 (0.72–1.09)	
200–349 cells/μl	0.63 (0.52–0.77)		0.82 (0.66–1.02)	
≥350 cells/μl	0.93 (0.77–1.22)		1.19 (0.92–1.54)	
CDC stage C (yes versus no)	1.27 (1.10–1.47)	0.002	1.20 (1.02–1.42)	0.032
Age at inclusion (years)		<0.001		<0.001
<30	1		1	
30–50	0.60 (0.52–0.70)		0.65 (0.56–0.76)	
>50	0.46 (0.37–0.57)		0.50 (0.40–0.63)	
Sex (female versus male)	1.58 (1.39–1.80)	<0.001	1.14 (0.97–1.33)	0.107
Transmission group		<0.001		<0.001
MSM	1		1	
IDU	2.04 (1.65–2.52)		1.75 (1.39–2.20)	
Heterosexual	1.85 (1.60–2.13)		1.48 (1.24–1.77)	
Other/unknown	1.42 (1.15–1.76)		1.24 (0.98–1.56)	
Period of ART initiation		<0.001		<0.001
1997–2002	1		1	
2003–2006	0.57 (0.49–0.65)		0.60 (0.51–0.69)	
2007–2011	0.27 (0.22–0.33)		0.31 (0.25–0.38)	

Adjusted for variables in the table and stratified on cohort. ART, antiretroviral therapy; CI, confidence interval; HR, hazard ratio; IDU, injection drug user; LLV, low-level viremia; PI/r, protease inhibitor-boosted with ritonavir; VL, viral load.

Table 3. Crude and adjusted hazard ratios for virological failure and AIDS event/death among patients experiencing low-level viremia (N = 1105).

Risk factor	Crude HR (95% CI)	P value	Adjusted HR (95% CI)	P value
Associations with VF				
LLV		<0.001		<0.001
LLV50–200	1		1	
LLV200–500	4.07 (2.64–6.28)		3.35 (2.14–5.26)	
Duration of LLV		0.459		0.985
LLV 1–3 months	1		1	
LLV 3–6 months	1.32 (0.71–2.45)		0.95 (0.49–1.81)	
LLV 6–12 months	1.30 (0.70–2.41)		0.89 (0.46–1.70)	
LLV >12 months	1.75 (0.88–3.48)		0.90 (0.42–1.92)	
ART at the beginning of LLV		0.247		0.925
2 NRTI + 1 NNRTI	1		1	
2 NRTI + 1 PI/r	0.79 (0.52–1.18)		1.02 (0.62–1.68)	
Modification of ART regimen during LLV ^a		0.018		0.180
No	1		1	
Yes	1.86 (1.11–3.11)		1.45 (0.84–2.49)	
Associations with AIDS event/death				
LLV		0.455		0.730
LLV50–200	1		1	
LLV200–500	0.80 (0.44–1.43)		0.87 (0.51–1.55)	
Duration of LLV		0.724		0.591
LLV 1–3 months	1		1	
LLV 3–6 months	0.63 (0.28–1.41)		0.73 (0.31–1.73)	
LLV 6–12 months	0.85 (0.41–1.76)		0.99 (0.43–2.28)	
LLV >12 months	0.81 (0.33–1.99)		0.89 (0.30–2.61)	
ART at the beginning of LLV		0.325		0.638
2 NRTI + 1 NNRTI	1		1	
2 NRTI + 1 PI/r	0.77 (0.49–1.38)		0.85 (0.51–1.47)	
Modification of ART regimen during LLV ^a		0.919		0.779
No	1		1	
Yes	1.04 (0.45–2.45)		1.13 (0.46–2.79)	

Stratified by cohort, adjusted on variables in the table and sex, baseline age, VL, CD4⁺ cell count, CDC stage at inclusion, transmission group, and period of ART initiation. ART, antiretroviral therapy; CI, confidence interval; HR, hazard ratio; IDU, injection drug user; LLV, low-level viremia; NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitor; PI/r, protease inhibitor-boosted with ritonavir; VF, virological failure.

^aModification of ART regimen: modification of at least one class of antiretroviral drugs.

Table 4 shows that in multivariate analyses, neither LLV50–199 nor LLV200–499 was associated with AIDS event/death (aHR 1.13, 95% CI 0.81–1.68; and aHR 0.95, 95% CI 0.62–1.48, respectively). No difference was found when these analyses were restricted to either AIDS event (aHR 1.11, 95% CI 0.79–1.61; and aHR 0.81, 95% CI 0.51–1.28 for LLV50–199 and LLV200–499, respectively) or death (aHR 1.19, 95% CI 0.78–1.82; and aHR 1.11, 95% CI 0.72–1.71 for LLV50–199 and LLV200–499, respectively). Baseline CD4⁺ cell count, AIDS stage, age, transmission group, and period of ART initiation were strongly associated with AIDS event/death. In sensitivity analyses restricted to patients experiencing LLV, neither type of ART regimen at LLV (PI/r-based versus NNRTI-based regimen), modification of ART regimen during LLV (at least one class of antiretroviral drug), nor cumulative duration of LLV was associated with AIDS event/death (Table 3).

Discussion

In this cohort study which included HIV-infected patients with viral load below 50 copies/ml 3–9 months

after starting potent combination ART, 6.2% of patients experienced LLV (LLV50–199 in 3.5% of patients and LLV200–499 in 2.7%). LLV200–499 was strongly associated with virological failure, but not with AIDS event/death. By contrast, there was little evidence that LLV50–199 was associated with either virological or clinical outcomes. Modification of ART regimen during LLV did not influence either the clinical or the virological outcome.

The prevalence of LLV in our study is consistent with previous studies, which found a prevalence of LLV between 50 and 500 copies/ml among patients on stable ART around 4–10% [6–8]. The phenomenon of LLV could result from the release of virus from stable reservoirs such as latently infected resting memory CD4⁺ T cells that are activated by antigenic stimulation [23–25]. It could also result from ongoing viral replication [25,26] because of suboptimal therapy (especially within anatomical compartments less accessible to antiretroviral drugs), facilitated by variations in drug concentrations (attributable to pharmacokinetic issues or incomplete adherence to drug regimens) and/or the emergence of drug resistance-associated mutations.

Table 4. Crude and adjusted hazard ratios for AIDS event/death, stratified by cohort (N = 17 896).

Risk factors	Crude HR (95% CI)	P value	Adjusted HR (95% CI)	P value
LLV		0.263		0.391
No LLV	1		1	
LLV50–200	1.30 (0.90–1.80)		1.13 (0.81–1.68)	
LLV200–500	1.07 (0.72–1.58)		0.95 (0.62–1.48)	
ART at inclusion		0.138		0.593
2 NRTI+1 NNRTI	1		1	
2 NRTI+1 PI/r	1.15 (0.96–1.39)		1.06 (0.86–1.30)	
VL at inclusion (log ₁₀ copies/ml)		0.035		0.637
<4.5	1		1	
4.5–5	1.02 (0.86–1.33)		0.92 (0.77–1.10)	
>5	1.19 (1.03–1.39)		0.94 (0.80–1.11)	
CD4 ⁺ cell count before ART		<0.001		<0.001
<50 cells/μl	1		1	
50–199 cells/μl	0.83 (0.65–1.07)		1.09 (0.89–1.32)	
200–349 cells/μl	0.53 (0.40–0.69)		0.81 (0.64–1.00)	
≥350 cells/μl	0.50 (0.36–0.69)		0.76 (0.58–0.99)	
CDC stage C (yes versus no)	2.00 (1.64–2.42)	<0.001	1.68 (1.43–1.97)	<0.001
Age at inclusion (years)		<0.001		<0.001
<30	1		1	
30–50	1.44 (1.16–1.78)		1.29 (1.03–1.60)	
>50	2.43 (1.92–3.08)		2.17 (1.70–2.76)	
Sex (female versus male)	0.97 (0.84–1.13)	0.728	0.97 (0.81–1.15)	0.728
Transmission group		<0.001		<0.001
MSM	1		1	
IDU	2.39 (2.80–4.53)		2.22 (1.80–2.74)	
Heterosexual	1.21 (0.75–1.20)		1.16 (0.97–1.39)	
Other/unknown	1.49 (1.44–2.47)		1.32 (1.06–1.65)	
Period of ART initiation		0.001		0.008
1997–2002	1		1	
2003–2006	0.88 (0.76–1.03)		0.78 (0.66–0.92)	
2007–2011	0.69 (0.57–0.85)		0.62 (0.50–0.77)	

Adjusted for variables in the table and stratified on cohort. ART, antiretroviral therapy; CI, confidence interval; HR, hazard ratio; IDU, injection drug user; LLV, low-level viremia; PI/r, protease inhibitor-boosted with ritonavir; VL, viral load.

The prognostic implications and optimal management strategy for LLV are still uncertain, because of a lack of controlled comparison data, especially for patients experiencing LLV between 50 and 199 copies/ml. The optimal target level of viral load suppression amongst patients receiving ART, and conversely the definition of virological failure, is also unclear [27]. Whilst currently used third-generation viral load assays have a lower limit of quantification of 20–50 copies/ml and can report qualitative RNA detection below these thresholds, the DHHS (USA) guidelines currently define virological failure as a confirmed viral load above 200 copies/ml [20]. This study provides evidence to support these guidelines, and against lowering that threshold.

Rates of virological failure were higher in patients who experienced LLV200–499 than in patients with sustained viral suppression, whereas LLV50–199 was only weakly associated with virological failure in our study. There are few data regarding the impact of persistent LLV between 50 and 500 copies/ml on virological outcome, especially LLV between 50 and 199 copies/ml. Our results support those of previous large studies which have reported a higher risk of virological failure in patients experiencing persistent LLV between 50 and 500 copies/ml than in those who maintained viral suppression [6,11,12], but these studies did not focus on LLV between 50 and

199 copies/ml. Greub *et al.* [6] found that among 2055 patients achieving viral suppression, two consecutive viral loads between 50 and 500 copies/ml increased the risk of virological failure (viral load >500 copies/ml) by more than five times (hazard ratio 5.8, 95% CI 4.26–7.90). Geretti *et al.* [11] found that among 1386 patients, the risk of virological failure (viral load >400 copies/ml) for patients with persistent LLV (defined as two consecutive viral loads between 50 and 400 copies/ml) was more than double that for patients whose viral load remained undetectable (hazard ratio 2.29, 95% CI 1.22–4.29). Unlike our study, Laprise *et al.* [13] found in their study including 1357 patients that both LLV50–199 copies/ml and LLV200–499 copies/ml (persistent for at least 6 months) doubled the risk of virological failure (defined as viral load >1000 copies/ml) compared with patients who maintained an undetectable viral load. Nevertheless, inclusion criteria differed from our study: whereas we only included patients under potent combination of antiretroviral drugs who achieved viral suppression, their patients were included if they had at least one viral load measurement and had received any antiretroviral drug for at least 12 months, regardless of the type of antiretroviral drug regimen [13].

We cannot exclude the fact that the association of LLV200–499 with the occurrence of viral load was partly

explained by the fact the levels of viremia in this group are closest to the threshold of virological failure. Nevertheless, this hypothesis should be minimized by the fact that the mean number of viral load measures per year of follow-up was similar in the three groups (no LLV, LLV50–199, and LLV200–49). Therefore, we believe that this association has a real clinical significance.

Resistance data were not available in the ART-CC database. Several recent studies have found that ongoing low-level viral replication (below 500 copies/ml) in patients receiving combination ART may promote the emergence and selection of drug-resistance mutations [14–16], even for LLV50–199 [7], which could negatively impact future ART options. For example, Delaugerre *et al.* [14] showed that 11 of 37 patients with persistent LLV episodes below 500 copies/ml while receiving ART developed at least one drug-resistance mutation. Moreover, Gonzalez-Serna *et al.* [18] and Swenson *et al.* [17] found that emergent HIV drug resistance at LLV was strongly associated with subsequent virological failure. Resistance genotyping should be performed in patients with persistent LLV and ART should be modified if resistance is detected.

The type of quantification assays might modify the prevalence of LLV. Highly sensitive quantification assays have shown discrepancies between them, especially evident at low levels of viremia, resulting in a significant difference in number of patients with detectable viral load [28–32]. All viral load measurements in our study were quantified with virological assays with lower limit of quantification below 50 copies/ml. However, the lack of accurate data regarding the precise type of quantification assays used in all patients did not allow us to include this variable in the multivariate analyses to account for interassay variability.

Although there is a lower ‘genetic barrier’ for NNRTI versus PI/r, which might be expected to increase the risk of emergent drug resistance and hence the risk of subsequent virological failure during LLV under NNRTI-based regimens, no association was found between the type of ART regimen at LLV (PI/r-based versus NNRTI-based regimen) and virological failure in the sensitivity analysis restricted to patients experiencing LLV. The modification of the ART regimen during LLV (especially with NNRTI-based regimens) could be a potential confounder, although only a small proportion of our patients modified their ART during LLV.

Although viral load has long been recognized as a prognostic factor for clinical progression, there is little literature on the association between LLV below 500 copies/ml and clinical outcomes. Zhang *et al.* [33] found no association between LLV (50–400 copies/ml) and non-AIDS disease. In our study, neither LLV50–199 nor LLV200–499 was associated with AIDS event/death,

compared with prolonged suppression. However, the lack of evidence of association between LLV and clinical outcomes may be due to the small number of endpoints and/or the fact that most of the patients who modified treatment after virological failure were re-suppressed. Moreover, the median clinical follow-up was 3.1 years, which might be insufficient to demonstrate an impact of LLV on mortality, mediated by virological failure or other mechanisms. LLV is one of the potential underlying causes of persistent immune activation and inflammation in HIV patients under ART, which could contribute to mortality and non-AIDS morbidity, including cardiovascular and end-organ disease [34–37]. Furthermore, LLV could contribute to the replenishment of latent viral reservoir [26], which is one of the obstacles to achieving eradication of HIV.

In conclusion, among patients virologically suppressed 3–9 months after starting potent combination ART and with a median follow-up of 2.3–3.1 years, persistent LLV between 200 and 499 copies/ml was strongly associated with virological failure, but not with AIDS event/death. The lack of association of persistent LLV between 50 and 199 copies/ml with virological failure or clinical outcomes, supports current guidelines, which define virological failure as a confirmed viral load above 200 copies/ml.

Acknowledgements

We thank all patients, doctors, and study nurses associated with the participating cohort studies.

Contribution of authors: Philippe Morlat and Geneviève Chene conceived the idea. Jonathan Sterne is the Principal Investigator for the ART Cohort Collaboration, which funded the research. Marie-Anne Vandenhende, Suzanne Ingle, Margaret May, and Jonathan Sterne did statistical analyses. Marie-Anne Vandenhende, did the literature search and wrote the first draft of the paper. All authors contributed to study design, collection of data, data interpretation, writing the paper, and approved the final version. Marie-Anne Vandenhende, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Funding: This work was supported by the UK Medical Research Council and the Department for International Development (DFID) (grants G0700820 and MR/J002380/1). Jonathan Sterne was supported by NIHR Senior Investigator Award NF-SI-0611–10168. Sources of funding of individual cohorts include the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les hépatites virales (ANRS), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the French, Italian and

Spanish Ministries of Health, the Swiss National Science Foundation (grant 33CS30_134277), the Ministry of Science and Innovation and the "Spanish Network for AIDS Research (RIS; ISCIII-RETIC RD06/006), the Stichting HIV Monitoring, the European Commission (EuroCoord grant 260694), the British Columbia and Alberta Governments, the National Institutes of Health (NIH) [UW Center for AIDS Research (CFAR) (NIH grant P30 AI027757), UAB CFAR (NIH grant P30-AI027767), The Vanderbilt-Meharry CFAR (NIH grant P30 AI54999), National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (U10-AA13566, U24-AA020794), the US Department of Veterans Affairs, the Michael Smith Foundation for Health Research, the Canadian Institutes of Health Research, the VHA Office of Research and Development and unrestricted grants from Abbott, Gilead, Tibotec-Upjohn, ViiV Healthcare, Merck Sharp & Dohme-Chibret, GlaxoSmithKline, Pfizer, Bristol Myers Squibb, Roche and Boehringer-Ingelheim.

Writing committee: Marie-Anne Vandenhende^{a,b}, Suzanne Ingle^c, Margaret May^c, Geneviève Chêne^a, Robert Zangerle^d, Ard Van Sighem^e, M. John Gill^f, Carolynne Schwarze-Zander^g, Beatriz Hernández-Novoa^h, Niels Obelⁱ, Ole Kirk^{j,k}, Sophie Abgrall^{k,l,m}, Jodie Guestⁿ, Hasina Samji^o, Antonella D'Arminio Monforte^p, Josep M. Llibre^q, Colette Smith^r, Matthias Cavassini^s, Greer A. Burkholder^t, Bryan Shepherd^u, Heidi M. Crane^v, Jonathan Sterne^c, and Philippe Morlat^{a,b}.

Institutional affiliations: ^aINSERM U897 and CIC-EC7, University of Bordeaux Segalen, ISPED (Bordeaux School of Public Health), CHU de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France; ^bService de médecine interne et maladies infectieuses, CHU de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France; ^cSchool of Social and Community Medicine, University of Bristol, Bristol, UK; ^dDepartment of Dermatology and Venerology, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria; ^eStichting HIV Monitoring, Amsterdam, the Netherlands; ^fDivision of Infectious Diseases, University of Calgary, Calgary, Canada; ^gDepartment of Internal Medicine I, University Hospital Bonn, Germany; ^hHospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain; ⁱDepartment of Infectious Diseases, Copenhagen University Hospital, Copenhagen, Denmark; ^jCopenhagen HIV Programme, Panum Institute, University of Copenhagen, Denmark; ^kUPMC Université Paris 06, UMR-S 943, F-75013, Paris, France; ^lINSERM, UMR-S 943, F-75013, Paris, France; ^mAP-HP; Hôpital Avicenne, Service des maladies infectieuses et tropicales, Bobigny F-93000, France; ⁿHIV Atlanta VA Cohort Study (HAVACS), Atlanta Veterans Affairs Medical Center, Decatur, Georgia, USA; ^oDivision of Epidemiology and Population Health, British Columbia Centre for Excellence in HIV/AIDS, Vancouver, Canada; ^pClinic of Infectious Diseases & Tropical Medicine, San Paolo Hospital, University of Milan,

Italy; ^qUniversity Hospital Germans Trias i Pujol and 'Lluita contra la SIDA' Foundation, Badalona, Spain; ^rResearch Department of Infection and Population Health, UCL, London, UK; ^sService of Infectious Diseases, Lausanne University Hospital and University of Lausanne, Lausanne, Switzerland; ^tDivision of Infectious Disease, Department of Medicine, University of Alabama, Birmingham, USA; ^uDepartment of Biostatistics, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee, USA; ^vCenter for AIDS Research, University of Washington, Seattle, USA

ART-CC contributing cohorts: Austrian HIV Cohort Study, AIDS Therapy Evaluation Project, Netherlands (ATHENA); Danish HIV Cohort Study, Agence Nationale de la Recherche sur le SIDA et les hépatites virales (ANRS) CO3 Aquitaine Cohort, France; ANRS CO4 French Hospital Database on HIV (FHDH); EuroSIDA Study Group; Italian Cohort of Antiretroviral-Naive Patients (ICONA); Köln/Bonn Cohort, Germany; Proyecto para la Informatización del Seguimiento Clínico-epidemiológico de la Infección por HIV y SIDA (PISCIS) Cohort, Spain; Cohorte de la Red de Investigación en Sida (CoRIS), Spain; Royal Free Hospital Cohort, London, UK; HAART Observational Medical Evaluation and Research (HOMER), British Columbia, Canada; South Alberta Clinic Cohort, Canada; Swiss HIV Cohort Study (SHCS); 1917 Clinic Cohort from the University of Alabama (UAB), USA; HIV Atlanta Veterans Affairs Cohort Study (HAVACS), USA; Vanderbilt-Meharry Center for AIDS Research, Nashville, Tennessee, USA; University of Washington HIV Cohort, Seattle, USA.

The funders had no role in the design and conduct of this study or in the decision to submit the manuscript for publication.

Conflicts of interest

Suzanne Ingle, Margaret May, Jodie Guest, Robert Zangerle, Beatriz Hernández-Novoa, Carolynne Schwarze-Zander have no conflicts of interest. Marie-Anne Vandenhende has travel/meeting expenses from Janssen-Cilag, Gilead and Merck Sharp & Dohme-Chibret and is a board member for Gilead. In the past 4 years, Geneviève Chêne has received consulting fees from Roche and has received travel grant from Lundbeck. G. Chêne has had scientific responsibilities in projects receiving specific grant supports that are managed through her Institution or a nonprofit society: from the French Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS), the European Commission (Framework Program 7), UK Medical Research Council, US National Institute of Health (NIH), Fondation Plan Alzheimer, Abbott, Boehringer Ingelheim, Bristol-Myers Squibb, Chiron, Fit Biotech LTD, Gilead Sciences, GlaxoSmithKline, Jansen Cilag, Merck Sharp & Dohme-Chibret, Pfizer, Roche, Tibotec, ViiV Healthcare. G.

Chêne serves as Academic Editor of Plos ONE and is on the editorial board of BMC Infectious Diseases Journal. Philippe Morlat has received honoraria or travel/meeting expenses from Abbott, Bristol-Myers Squibb, Gilead, Merck Sharp & Dohme-Chibret, Pfizer, Janssen-Cilag and ViiV Healthcare. Josep M Llibre has received research funding, consultancy fees, and lecture sponsorships from or has served on advisory boards for Abbott, Boehringer Ingelheim, Bristol-Myers Squibb, Gilead Sciences, Glaxo Smith-Kline, Janssen-Cilag, Merck Sharp & Dohme, and ViiV Healthcare. Antonella d'Arminio Monforte is a board member for Bristol-Myers Squibb, Abbvie, Gilead, Janssen, and Merck Sharp & Dohme-Chibret, and has grants pending from Merck Sharp & Dohme-Chibret, Janssen and Gilead. Matthias Cavassini has consulted for Bristol-Myers Squibb, Boehringer-Ingelheim, Gilead, Merck Sharp & Dohme-Chibret and Janssen Cilag, has grants pending from Bristol-Myers Squibb, Gilead and Merck Sharp & Dohme-Chibret, has received payment for service on speakers bureaus from Gilead and travel/meeting expenses from Boehringer-Ingelheim, Bristol-Myers Squibb and Gilead. M. John Gill is a board member for Abbvie, Gilead, Merck Sharp & Dohme-Chibret, Janssen and ViiV Healthcare. Jonathan Sterne has received payment for development of educational presentations from Gilead. Heidi M. Crane has grants pending from NIH, AHRQ, CDC, HRSA and has received payment for development of educational presentations from WebMD. Niels Obel has received research funding from Roche, Bristol-Myers Squibb, Merck Sharp & Dohme, GlaxoSmithKline, Abbott, Boehringer Ingelheim, Janssen-Cilag and Swedish Orphan. Colette Smith has funding from BMS, prepared educational material for ViiV, Janssen, BMS, Gilead and attended an Ad board for Gilead. Ole Kirk had prior board membership at ViiV Healthcare, received payment for lectures and/or for development of educational presentations from Abbott, Gilead and Tibotec/Janssen Cilag, and had expenses to travel/accommodations/meetings covered by Abbott, Bristol-Myers Squibb, Gilead, Merck and ViiV Healthcare. Sophie Abgrall is a board member for Janssen-Cilag, and has received payment for service on speakers bureaus from Gilead, and travel/meeting expenses from Janssen-Cilag, Gilead and Abbott.

References

1. Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, *et al.* **Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators.** *N Engl J Med* 1998; **338**:853–860.
2. Thiebaut R, Morlat P, Jacqmin-Gadda H, Neau D, Mercie P, Dabis F, *et al.* **Clinical progression of HIV-1 infection according to the viral response during the first year of antiretroviral treatment. Groupe d'Epidemiologie du SIDA en Aquitaine (GECSA).** *AIDS* 2000; **14**:971–978.
3. EACS. European AIDS Clinical Society. European Guidelines for treatment of HIV infected adults in Europe. Version 6.1 (2012). <http://www.europeanaidscinicalociety.org/images/stories/EACS-Pdf/EacsGuidelines-v6.1-2edition.pdf>.
4. Thompson MA, Aberg JA, Hoy JF, Telenti A, Benson C, Cahn P, *et al.* **Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2012 recommendations of the International Antiviral Society-USA panel.** *JAMA* 2012; **308**:387–402.
5. Cohen C. **Low-level viremia in HIV-1 infection: consequences and implications for switching to a new regimen.** *HIV Clin Trials* 2009; **10**:116–124.
6. Greub G, Cozzi-Lepri A, Ledergerber B, Staszewski S, Perrin L, Miller V, *et al.* **Intermittent and sustained low-level HIV viral rebound in patients receiving potent antiretroviral therapy.** *AIDS* 2002; **16**:1967–1969.
7. Taiwo B, Gallien S, Aga E, Ribaudo H, Haubrich R, Kuritzkes DR, *et al.* **Antiretroviral drug resistance in HIV-1-infected patients experiencing persistent low-level viremia during first-line therapy.** *J Infect Dis* 2011; **204**:515–520.
8. Garcia-Gasco P, Maida I, Blanco F, Barreiro P, Martin-Carbonero L, Vispo E, *et al.* **Episodes of low-level viral rebound in HIV-infected patients on antiretroviral therapy: frequency, predictors and outcome.** *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**:699–704.
9. Havlir DV, Bassett R, Levitan D, Gilbert P, Tebas P, Collier AC, *et al.* **Prevalence and predictive value of intermittent viremia with combination HIV therapy.** *JAMA* 2001; **286**:171–179.
10. Karlsson AC, Younger SR, Martin JN, Grossman Z, Sinclair E, Hunt PW, *et al.* **Immunologic and virologic evolution during periods of intermittent and persistent low-level viremia.** *AIDS* 2004; **18**:981–989.
11. Geretti AM, Smith C, Haberl A, Garcia-Diaz A, Nebbia G, Johnson M, *et al.* **Determinants of virological failure after successful viral load suppression in first-line highly active antiretroviral therapy.** *Antivir Ther* 2008; **13**:927–936.
12. Sungkanupapong S, Groger RK, Overton ET, Fraser VJ, Powderly WG. **Persistent low-level viraemia and virological failure in HIV-1-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy.** *HIV Med* 2006; **7**:437–441.
13. Laprise C, de Pokomandy A, Baril JG, Dufresne S, Trottier H. **Virologic failure following persistent low-level viremia in a cohort of HIV-positive patients: results from 12 years of observation.** *Clin Infect Dis* 2013; **57**:1489–1496.
14. Delaugerre C, Gallien S, Flandre P, Mathez D, Amarsy R, Ferret S, *et al.* **Impact of low-level-viremia on HIV-1 drug-resistance evolution among antiretroviral treated-patients.** *PLoS One* 2012; **7**:e36673.
15. Li JZ, Gallien S, Do TD, Martin JN, Deeks S, Kuritzkes DR, *et al.* **Prevalence and significance of HIV-1 drug resistance mutations among patients on antiretroviral therapy with detectable low-level viremia.** *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**:5998–6000.
16. Gallien S, Delaugerre C, Charreau I, Braun J, Boulet T, Barrail-Tran A, *et al.* **Emerging integrase inhibitor resistance mutations in raltegravir-treated HIV-1-infected patients with low-level viremia.** *AIDS* 2011; **25**:665–669.
17. Swenson LC, Min JE, Woods CK, Cai E, Li JZ, Montaner JS, *et al.* **HIV drug resistance detected during low-level viraemia is associated with subsequent virologic failure.** *AIDS* 2014; **28**:1125–1134.
18. Gonzalez-Serna A, Min JE, Woods C, Chan D, Lima VD, Montaner JS, *et al.* **Performance of HIV-1 drug resistance testing at low-level viremia and its ability to predict future virologic outcomes and viral evolution in treatment-naïve individuals.** *Clin Infect Dis* 2014; **58**:1165–1173.
19. Corbeau P, Reynes J. **Immune reconstitution under antiretroviral therapy: the new challenge in HIV-1 infection.** *Blood* 2011; **117**:5582–5590.
20. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services. 2014. <http://www.aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adultandadolescentgl.pdf>.
21. May MT, Ingle SM, Costagliola D, Justice AC, de Wolf F, Cavassini M, *et al.* **Cohort profile: Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration (ART-CC).** *Int J Epidemiol* 2014; **43**:691–702.
22. CDC CfDCaP. **1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults.** *MMWR Recomm Rep* 1992; **41**:1–19.

23. Richman DD, Margolis DM, Delaney M, Greene WC, Hazuda D, Pomerantz RJ. **The challenge of finding a cure for HIV infection.** *Science* 2009; **323**:1304–1307.
24. Shen L, Siliciano RF. **Viral reservoirs, residual viremia, and the potential of highly active antiretroviral therapy to eradicate HIV infection.** *J Allergy Clin Immunol* 2008; **122**:22–28.
25. Tobin NH, Learn GH, Holte SE, Wang Y, Melvin AJ, McKernan JL, et al. **Evidence that low-level viremias during effective highly active antiretroviral therapy result from two processes: expression of archival virus and replication of virus.** *J Virol* 2005; **79**:9625–9634.
26. Ramratnam B, Mittler JE, Zhang L, Boden D, Hurley A, Fang F, et al. **The decay of the latent reservoir of replication-competent HIV-1 is inversely correlated with the extent of residual viral replication during prolonged antiretroviral therapy.** *Nat Med* 2000; **6**:82–85.
27. Doyle T, Geretti AM. **Low-level viraemia on HAART: significance and management.** *Curr Opin Infect Dis* 2012; **25**:17–25.
28. Ruelle J, Debaisieux L, Vancutsem E, De Bel A, Delforge ML, Pierard D, et al. **HIV-1 low-level viraemia assessed with 3 commercial real-time PCR assays show high variability.** *BMC Infect Dis* 2012; **12**:100–105.
29. Sire JM, Vray M, Merzouk M, Plantier JC, Pavie J, Maylin S, et al. **Comparative RNA quantification of HIV-1 group M and non-M with the Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 v2.0 and Abbott Real-Time HIV-1 PCR assays.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011; **56**:239–243.
30. Karasi JC, Dziezuk F, Quennessy L, Forster S, Reischl U, Colucci G, et al. **High correlation between the Roche COBAS(R) AmpliPrep/COBAS(R) TaqMan(R) HIV-1, v2.0 and the Abbott m2000 RealTime HIV-1 assays for quantification of viral load in HIV-1 B and non-B subtypes.** *J Clin Virol* 2011; **52**:181–186.
31. Lima V, Harrigan R, Montaner JS. **Increased reporting of detectable plasma HIV-1 RNA levels at the critical threshold of 50 copies per milliliter with the Taqman assay in comparison to the Amplicor assay.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009; **51**:3–6.
32. Verhofstede C, Van Wanzeele F, Reynaerts J, Mangelschots M, Plum J, Fransen K. **Viral load assay sensitivity and low level viremia in HAART treated HIV patients.** *J Clin Virol* 2010; **47**:335–339.
33. Zhang S, van Sighem A, Kesselring A, Gras L, Smit C, Prins JM, et al. **Episodes of HIV viremia and the risk of non-AIDS diseases in patients on suppressive antiretroviral therapy.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012; **60**:265–272.
34. Hunt PW. **HIV and inflammation: mechanisms and consequences.** *Curr HIV/AIDS Rep* 2012; **9**:139–147.
35. Tien PC, Choi AI, Zolopa AR, Benson C, Tracy R, Scherzer R, et al. **Inflammation and mortality in HIV-infected adults: analysis of the FRAM study cohort.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010; **55**:316–322.
36. Hsue PY, Deeks SG, Hunt PW. **Immunologic basis of cardiovascular disease in HIV-infected adults.** *J Infect Dis* 2012; **205** (Suppl 3):S375–S382.
37. Justice AC, Freiberg MS, Tracy R, Kuller L, Tate JP, Goetz MB, et al. **Does an index composed of clinical data reflect effects of inflammation, coagulation, and monocyte activation on mortality among those aging with HIV?** *Clin Infect Dis* 2012; **54**:984–994.

C. IMPACT PRONOSTIQUE D'UNE CHARGE VIRALE DE FAIBLE NIVEAU PERSISTANTE SUR L'EVOLUTION VIROLOGIQUE (COHORTE ANRS CO3 AQUITAINE, 2000-2011)

I. Objectif de l'étude

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'impact pronostique d'une charge virale VIH de faible niveau persistante entre 50 et 200 copies/ml (CVF50-200) sur l'évolution virologique, à savoir le risque de survenue d'un échec virologique sous traitement ARV, selon le type de schéma thérapeutique (2 INTI + 1 INNTI versus 2 INTI + 1 IP/r), l'histoire thérapeutique du patient (naïf ou non de traitement ARV) et la durée de la CVF.

II. Méthodologie de l'étude :

Population de l'étude :

Une étude de cohorte a été réalisée en utilisant les données de la Cohorte ANRS CO3 Aquitaine. Cette cohorte ouverte prospective régionale et multicentrique (13 centres localisés en Aquitaine) a été initiée en 1987 par le GECSA. Les principaux critères d'inclusion sont : patients infectés par le VIH-1, quel que soit le stade clinique, vus au moins deux fois en consultation ou en hospitalisation, âgés d'au moins 13 ans à l'inclusion et ayant signé un consentement écrit éclairé (8677 patients inclus au 30 juin 2013 dont 3541 en file active). Un questionnaire permet la collecte confidentielle et standardisée des données cliniques, biologiques, thérapeutiques et épidémiologiques lors de chaque consultation ou hospitalisation. Le Centre de Recherche INSERM U897, au sein de l'ISPED de l'Université de Bordeaux assure

la coordination épidémiologique de la Cohorte Aquitaine. Le projet de la Cohorte Aquitaine a reçu un avis favorable de la CNIL le 05 juillet 1988.

Les patients de l'étude répondaient aux critères d'inclusion suivants :

- Patients de plus de 18 ans inclus et suivis dans la Cohorte Aquitaine entre le 1^{er} janvier 2000 et le 31 décembre 2011
- Naïfs ou non de traitement ARV
- Débutant un traitement ARV après 2000 pendant au moins 6 mois consécutifs comportant
 - Soit 2 INTI + un INNTI (Efavirenz, Névirapine, Etravirine ou Rilpivirine),
 - Soit 2 INTI + un IP/r (Lopinavir, Atazanavir ou Darunavir)
- Ayant une CV < 200 copies/ml après 4 à 8 mois de traitement ARV
- Les techniques virologiques de quantification de la CV VIH utilisées avaient une limite inférieure du seuil de quantification < 50 copies/ml pour l'ensemble des CV mesurées.

Les caractéristiques démographiques, cliniques, biologiques et thérapeutiques des patients ont été extraites de la base de données de la cohorte.

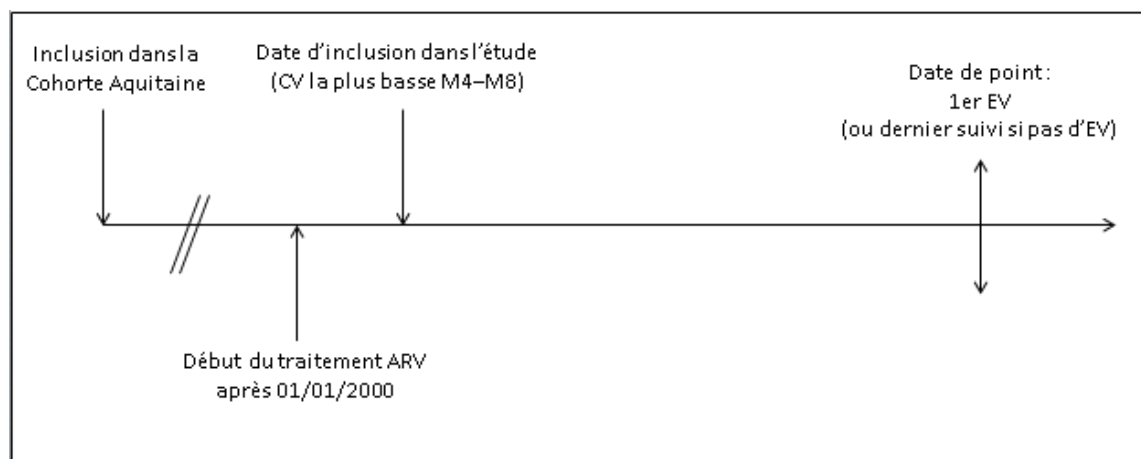
Analyses statistiques

La date d'inclusion dans notre étude était la date de la CV < 200 copies/ml la plus basse 4 à 8 mois après le début du traitement ARV (Figure 8).

L'événement d'intérêt était la survenue d'un premier échec virologique sous traitement ARV, défini par 2 CV consécutives ≥ 200 copies/ml après l'inclusion, ou une CV ≥ 200 copies/ml avec modification du régime thérapeutique (addition ou suppression d'au moins une classe thérapeutique parmi INTI, INNTI, IP/r, inhibiteur d'intégrase, inhibiteur de fusion, inhibiteur

du CCR5, une modification parmi une même classe thérapeutique n'étant pas considérée comme une modification du régime thérapeutique) avant la CV suivante (la date de l'EV étant la date de la première CV ≥ 200 copies/ml).

Figure 8: Schéma de l'étude Aquitaine ANRS CO3



Les CVF50-200 étaient définies par la survenue après l'inclusion d'au moins 2 CV consécutives (mesurées entre 15j et 6 mois d'intervalle) comprises entre 50 et 199 copies/ml pendant une durée d'au moins 1 mois (date entre la première et la dernière des CV consécutives comprises entre 50 et 199 copies/ml). Les patients étaient suivis jusqu'à la survenue d'un premier EV, leur dernier suivi virologique ou la date de clôture de la base de données (31 décembre 2011).

Les patients étaient inclus dans le groupe « CVF50-200 » à partir du début du premier épisode de CVF50-200 (date de la seconde des 2 CV consécutives entre 50 et 199 copies/ml définissant la CVF). Une fois qu'un patient était exposé à la survenue d'une CVF50-200, il restait dans ce groupe jusqu'à la fin du suivi.

Les caractéristiques à l'inclusion des patients présentant une CVF50-200 ont été comparées à ceux ne présentant pas de CVF en utilisant le test de Kruskal-Wallis pour les variables

quantitatives et le test du χ^2 pour les variables qualitatives. Nous avons de plus réalisé une analyse univariée puis multivariée par un modèle de régression logistique pour déterminer les facteurs de risque associés à la survenue d'une CVF50-200.

Le délai de survenue d'un EV selon l'exposition ou non à une CVF50-200 a été analysé par des courbes de survie selon la méthode de Kaplan-Meier avec utilisation du test de Log-rank pour comparer les groupes.

L'utilisation de modèles de régression de Cox univariés puis multivariés a permis d'estimer l'association entre la survenue d'une CVF50-200 (en comparaison au groupe pas de CVF) et la survenue d'un EV. Les modèles ont été ajustés sur l'âge (<30, 30-49 et ≥ 50 ans), le sexe, la période d'inclusion (2000-2003, 2004-2007, 2008-2011), le type de régime thérapeutique (IP/r versus INNTI), l'historique de traitement ARV (naïf versus non-naïf), le groupe de transmission présumé (HSH, UDI, transmission hétérosexuelle, autres), le stade de la classification CDC (stade C versus stade non C), le taux médian de CD4 (0-99, 100-199, 200-349, 350-499 et ≥ 500 cellules/mm³) et la CV (<1.7, 1.7-2.9, 3-3.9, 4-4.9 et $\geq 5 \log_{10}$ copies/ml) à l'initiation du traitement ARV. L'hypothèse de proportionnalité des risques (effet des variables indépendant du temps) a été vérifiée par le test statistique des résidus de Schoenfeld.

Une analyse multivariée selon le modèle de Cox restreinte aux patients ayant présenté une CVF50-200 a été réalisée afin d'étudier l'association entre le type de régime thérapeutique lors de la CVF50-200 (IP/r versus INNTI) et sa durée cumulée (< 3, 3-6, 6-12 et > 12 mois) avec la survenue d'un EV, ajustée sur les mêmes variables que l'analyse principale.

Des analyses de sensibilités complémentaires ont été réalisées selon l'historique de traitement ARV à l'inclusion (analyse restreinte aux patients naïfs de traitement puis restreinte aux patients non-naïfs de traitement ARV à l'inclusion).

Des analyses de sensibilité restreintes aux patients ayant une CV à l'inclusion (4-8 mois après le début du traitement) < 50 copies/ml ont été réalisées avec la même méthodologie précédemment décrite (modèle de régression logistique pour déterminer les facteurs de risque associés à la survenue d'une CVF50-200 et modèle de Cox pour estimer l'association entre CVF50-200 et EV).

Une analyse de sensibilité complémentaire a été réalisée visant à comparer le risque de survenue d'EV entre les patients ayant présenté une CF50-200 et les patients dont l'ensemble des CV entre l'inclusion et l'EV (ou le dernier suivi) était inférieure à 50 copies/ml (exclusion des patients ayant présentés des « blips » de $CV \geq 50$ copies/ml précédés et suivis d'une $CV < 50$ copies/ml).

L'ensemble des analyses a été réalisée sur le logiciel Stata (version 12.0, College Station, Texas, USA).

III. Résultats

1. Population de l'étude et caractéristiques des CVF50-200

Les caractéristiques des patients sont présentées dans le Tableau 10.

Parmi les 2374 patients inclus, 205 (8.6%) ont présenté au moins un épisode de CVF50-200 avec une durée médiane de 8.3 mois (interquartile range [IQR]: 5.9-13.8) et une médiane de CV durant la CVF50-200 à 94 copies/ml (IQR 74-116). Le nombre moyen de mesure de CV par année de suivi était similaire dans les 2 groupes (3.14 [IQR: 2.66-3.67] pour les patients du groupe « pas de CVF » et 3.35 [IQR: 2.92-3.82] pour les patients du groupe « CVF50-200 »).

Parmi les 205 patients ayant présenté une CVF50-200, 11 (5.4%) ont modifié leur régime thérapeutique (au moins une classe d'ARV) durant la période de CVF (6.5% des patients sous INNTI et 3.5% des patients sous IP/r, $p=0.364$). Aucun de ces 11 patients n'avait une $CV \geq 200$ copies/ml au décours de la CVF50-200 versus 22% des 194 patients n'ayant pas modifié leur traitement durant la CVF50-200.

Dans l'analyse multivariée par régression logistique des facteurs de risque de CVF50-200, le type de régime thérapeutique (2INTI+1IP/r versus 2INTI+1INNTI), la CV à l'initiation du traitement ($CV > 5\log$ et $CV > 4.5\log$ versus $CV < 4.5\log$) et la période d'inclusion (1997-2002 versus 2003-2006 et 2007-2011) étaient associés à un risque plus élevé de survenue d'une CVF50-200. L'âge, le sexe, l'historique de traitement ARV, le taux de CD4 à l'initiation du traitement, le stade C et le groupe de transmission n'étaient pas associés à un risque plus élevé de survenue de CVF50-200 (Tableau 11). L'analyse restreinte aux 2131 patients ayant une $CV < 50$ copies/ml à l'inclusion (parmi lesquels 127 soit 6.0% ont présenté au moins un épisode de CVF50-200) retrouve les mêmes facteurs de risque de survenue d'une CVF50-200, mais retrouve en plus que l'historique de traitement ARV (patients pré-traités versus naïfs) est

associé à un risque plus élevé de survenue de CVF50-200, avec un Odds ratio dans l'analyse multivarié à 1.95 (IC95% : 1.14-3.32).

Tableau 10: Caractéristiques des patients à l'inclusion (N=2374)

Caractéristiques	Pas de CVF n=2169 (91.4%)	CVF50-200¹ n=205 (8.6%)	p value
Durée médiane de suivi, années (IQR)	3.1 (1.3-5.5)	2.3 (1.0-4.2)	
Sexe masculin, n (%)	1564 (72.1%)	161 (78.5%)	0.048
Age médian, années (IQR)	42.6 (36.7;49.1)	41.8 (38.0;49.8)	0.493
Groupe de transmission, n (%)			0.118
HSH	882 (40.7%)	80 (39.0%)	
UDI	773 (35.6%)	67 (32.7%)	
Hétérosexuelle	325 (15.0%)	43 (21.0%)	
Autres	189 (8.7)	15 (7.3%)	
Stade C, n (%)	462 (21.3%)	48 (23.4%)	0.527
Date d'inclusion, n (%)			<0.001
2000-2003	597 (27.5%)	83 (40.5%)	
2004-2007	979 (45.2%)	87 (42.4%)	
2008-2011	593 (27.3%)	35 (17.1%)	
Taux médian de CD4, cellules/mm3 (IQR)	357 (239-526)	320 (179-522)	0.078
CV VIH médiane, log₁₀ copies/ml (IQR)	2.6 (1.7-4.6)	3.6 (1.7-5.2)	<0.001
Naïf de traitement ARV, n (%)	824 (38.0%)	69 (33.7%)	0.221
Type de traitement ARV, n (%)			0.009
2INTI+1INNTI	947 (43.7%)	70 (34.1%)	
2INTI+1IP/r	1222 (56.3%)	135 (65.9%)	

¹CVF50-200 : au moins 2 CV consécutives comprises entre 50 et 199 copies/ml

CV : charge virale, IQR: interquartile range, ARV: Antirétroviral, HSH: homme ayant des relations sexuelles avec des hommes, UDI : usager de drogues intraveineuses, INTI : inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse, INNTI : inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse, IP/r: inhibiteur de protéase boosté par du ritonavir

Tableau 11: Analyses univariées et multivariées par régression logistique des facteurs de risque de survenue d'une CVF50-200 (Cohorte ANRS CO3 Aquitaine 2000-2011)

Caractéristiques	OR (IC 95%)	p-value	OR ajusté (IC 95%)	p-value
Traitement ARV à l'inclusion		0.137		0.005
- 2INTI+1INNTI	1		1	
- 2INTI+1IP/r	1.44 (0.89-2.34)		1.89 (1.21-3.49)	
CV à l'initiation des ARV		0.004		0.010
- <4.5 log10 copies/ml	1		1	
- 4.5-5 log10 copies/ml	1.26 (0.57-2.80)		1.41 (0.61-3.30)	
- >5 log10 copies/ml	2.60 (1.51-4.49)		2.93 (1.46-5.86)	
Taux de CD4 à l'initiation des ARV		0.049		0.372
- <50 cellules/mm ³	1		1	
- 50-199 cellules/mm ³	0.58 (0.23-1.46)		0.70 (0.24-2.00)	
- 200-349 cellules/mm ³	0.31 (0.13-0.76)		0.52 (0.18-1.52)	
- ≥350 cellules/mm ³	0.36 (0.15-0.83)		0.91 (0.31-2.69)	
Stade C à l'inclusion (Oui vs Non)	1.07 (0.62-1.85)	0.790	0.78 (0.40-1.51)	0.465
Naïf (Oui vs Non)	1.25 (0.78-1.99)	0.347	1.12 (0.61-2.06)	0.706
Age à l'inclusion (années)		0.154		0.373
- <30	1		1	
- 30-50	1.31 (0.50-3.44)		1.15 (0.40-3.39)	
- >50	1.78 (0.94-3.36)		1.60 (0.79-3.22)	
Sexe (masculin vs féminin)	1.28 (0.75-2.17)	0.361	1.33 (0.65-2.73)	0.431
Groupe de transmission		0.538		0.736
- HSH	1		1	
- UDI	0.80 (0.46-1.38)		0.93 (0.45-1.90)	
- Hétérosexuelle	1.30 (0.70-2.41)		1.13 (0.53-2.42)	
- Autre/inconnu	1.14 (0.49-2.67)		1.56 (0.61-3.93)	
Période d'inclusion		0.001		0.006
- 2008-2011	1		1	
- 2004-2007	1.07 (1.56-4.37)		1.04 (0.52-2.04)	
- 2000-2003	2.60 (0.59-1.96)		2.78 (1.42-5.45)	

CVF : Charge virale de faible niveau persistante, IC : intervalle de confiance, OR : odds ratio (ajusté sur les variables du tableau), CV : charge virale, ARV: Antirétroviral, HSH: homme ayant des relations sexuelles avec des hommes, UDI, usager de drogues intraveineuses, INTI : inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse, INNTI : inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse, IP/r: inhibiteur de protéase boosté par du ritonavir

2. Evolution virologique : survenue d'un EV ≥ 200 copies/ml

Durant 9059 patients-années (PA) avec un suivi médian de 3.0 ans (IQR : 1.3-5.4) :

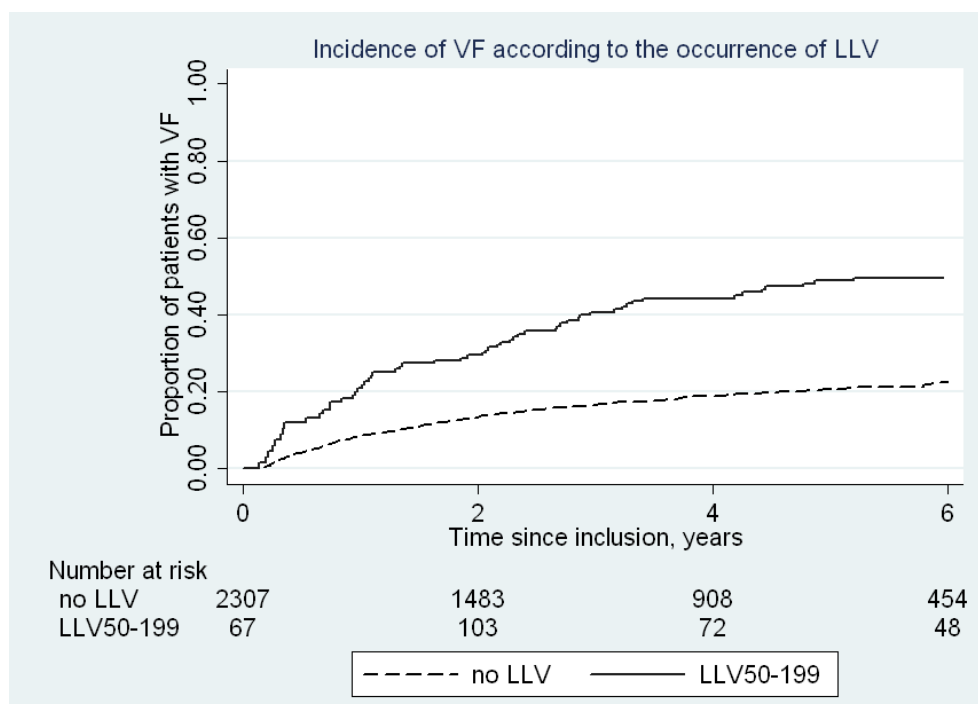
- 401 patients (18.5%) ont présenté un échec virologique (EV) parmi les 2169 du groupe « pas de CVF », correspondant à 4.7 (intervalle de confiance à 95% [IC 95%]: 4.3-5.2) EV pour 100PA
- 56 patients (27.3%) ont présenté un EV parmi les 205 du groupe « CVF50-200 », correspondant à 9.6 (7.3-12.5) EV pour 100PA (10.6 [7.1-15.6] EV pour 100PA pour les patients sous INNTI et 8.9 [6.3-12.7] EV pour 100PA pour les patients sous IP/r lors de la CVF50-200).

Parmi les 56 patients présentant une CVF50-200 suivie d'un EV, le délai médian entre la survenue de la CVF50-200 et l'EV était de 8.6 mois (IQR 3.6-22.3). Ce délai était de 6.2 mois (3.0-11.2) pour les patients sous INNTI lors de la CVF50-200 et de 11.3 mois (4.3-24.4) pour les patients sous IP/r lors de la CVF50-200 ($p=0.660$).

L'analyse de survenue d'un EV par courbes de survie de Kaplan-Meier (selon la survenue d'une CVF50-200) est présentée Figure 9. Le délai pour que 20% des patients présentent un EV était de 4.6 ans (IC95% : 3.7-5.9) pour les patients du groupe « pas de CVF » et de 1.0 an (0.3-1.9) pour les patients du groupe « CVF50-200 » ($p<0.001$).

Parmi les patients du groupe « pas de CVF », 8.4% (IC 95%: 7.3-9.6) étaient en EV à 1 an et 13.3% (IC 95%: 11.9-14.9) à 2 ans. Parmi les patients exposés à une CVF50-200, 20.8% (IC 95%: 13.4-31.5) étaient en EV à 1an et 29.4% (IC 95%: 21.3-39.8) à 2 ans.

**Figure 9: Incidence cumulée des échecs virologiques selon la survenue d'une CVF50-200
- Cohorte ANRS CO3 Aquitaine 2000-2011**



Dans les analyses multivariées selon le modèle de Cox (Tableau 12), la survenue d'une CVF50-200 était fortement associée à la survenue d'un EV (HRa: 2.3, IC 95%: 1.7-3.2). Le HRa était de 3.2 (IC 95%: 1.9-5.4) pour les 1017 patients sous INNTI à l'inclusion et de 1.8 (IC 95%: 1.2-2.8) pour les 1357 patients sous IP/r à l'inclusion. L'âge < 30 ans, le sexe féminin, la période d'inclusion < 2003, le stade C, une CV>3 log et l'historique de traitement ARV (patients pré-traités) à la date d'inclusion étaient également fortement associés à la survenue d'un EV. Aucune association significative n'a été mise en évidence entre le type de régime thérapeutique à l'inclusion (INNTI versus IP/r) et la survenue d'un EV. Ces résultats étaient similaires dans l'analyse restreinte aux patients ayant une CV < 50 copies/ml à l'inclusion.

Dans l'analyse de sensibilité restreinte aux patients ayant présenté une CVF50-200, le type de régime thérapeutique lors de la CVF50-200 (IP/r versus INNTI) n'était pas associé à la survenue d'un EV (HRa: 0.5, IC 95%: 0.2-1.3). De plus, dans cette analyse, la durée de CVF50-200 (<3,

3-6, 6-12, >12 mois) n'était également pas associée à un risque plus élevé d'EV. Il faut souligner qu'aucun des 11 patients ayant modifié son traitement durant la CVF n'a présenté d'EV.

Parmi les 893 patients naïfs inclus dans notre étude, 105 patients (12.7%) ont présenté un EV parmi les 824 patients du groupe « pas de CVF » et 7 patients (10.1%) parmi les 69 patients du groupe « CVF50-200 ». Dans l'analyse de sensibilité restreinte à ces patients naïfs à l'inclusion, la survenue d'une CVF50-200 n'était plus associée à un risque plus élevé d'EV (HRa: 0.8, IC 95%: 0.4-2.0), et ce quels que soient la durée de la CVF50-200 et le type de régime thérapeutique lors de la CVF50-200 (IP/r versus INNTI). A l'opposé, la survenue d'une CVF50-200 était fortement associée à un risque plus élevé d'EV chez les patients non-naïfs de traitement ARV à l'inclusion (HRa: 3.02, IC 95%: 2.10-4.33).

Dans l'analyse de sensibilité comparant aux patients ayant présenté une CF50-200 les patients dont l'ensemble des CV entre l'inclusion et l'EV (ou le dernier suivi) était inférieure à 50 copies/ml, la survenue d'une CVF50-200 était également fortement associée à la survenue d'un EV (HRa: 2.0, IC 95%: 1.4-2.8).

Cette étude a été publiée dans la revue Antiviral Therapy en mars 2015.

Risk of virological failure in HIV-1 infected patients experiencing low-level viremia under active antiretroviral therapy (ANRS C03 cohort study). Antiviral Therapy 2015 Mar 4, epub ahead of print

M-A.Vandenhende, A. Perrier, F. Bonnet, E. Lazaro, C. Cazanave, S.Reigadas, G. Chêne, P.Morlat; Groupe d'Epidémiologie Clinique du SIDA en Aquitaine.

Tableau 12: Analyses univariées et multivariées selon le modèle de Cox de la survenue d'un échec virologique (2 CV \geq 200 copies/ml) selon la survenue d'une CVF (Cohorte ANRS CO3 Aquitaine 2000-2011)

Caractéristiques	HR (IC 95%)	p-value	HR ajusté* (IC 95%)	p-value
CVF		<0.001		<0.001
- pas de CVF	1		1	
- CVF50-200	2.55 (1.92-3.38)		2.30 (1.66-3.20)	
Traitement ARV		0.069		0.160
- 2INTI+1INNTI	1		1	
- 2INTI+1IP/r	1.19 (0.99-1.43)		1.12 (0.87-1.45)	
Naïf d'ARV (Non vs Oui)	1.67 (1.35-2.06)	<0.001	1.77 (1.34-2.32)	<0.001
CV à l'initiation des ARV		<0.001		<0.001
- <1.7 log10 copies/ml	1		1	
- 1.7-2.9 log10 copies/ml	1.39 (0.98-1.99)		1.43 (0.99-2.05)	
- 3-3.9 log10 copies/ml	2.10 (1.48-2.98)		2.05 (1.40-2.99)	
- 4-4.9 log10 copies/ml	1.92 (1.45-2.56)		2.35 (1.68-3.29)	
- \geq 5 log10 copies/ml	1.72 (1.27-2.33)		2.18 (1.48-3.22)	
Taux de CD4 à l'initiation des ARV		0.004		0.211
- \geq 500 cellules/mm ³	1		1	
- 350-500 cellules/mm ³	1.01 (0.75-1.33)		0.85 (0.62-1.16)	
- 200-349 cellules/mm ³	1.05 (0.82-1.37)		0.85 (0.62-1.16)	
- 100-199 cellules/mm ³	1.68 (1.24-2.27)		1.29 (0.79-1.89)	
- <100 cellules/mm ³	1.45 (1.02-2.04)		0.91 (0.61-1.46)	
stade C à l'inclusion (Oui vs Non)	1.38 (1.12-1.70)	0.002	1.31 (1.01-1.69)	0.039
Age à l'inclusion (années)		<0.001		0.001
- >50	1		1	
- 30-50	1.67 (1.29-2.18)		1.17 (0.87-1.57)	
- <30	2.53 (1.79-3.58)		1.98 (1.34-2.94)	
Sexe (féminin vs masculin)	1.44 (1.19-1.75)	<0.001	1.74 (1.31-2.31)	<0.001
Groupe de transmission		0.010		0.333
HSH	1		1	
UDI	0.98 (0.78-1.22)		0.84 (0.58-1.19)	
Hétérosexuelle	1.49 (1.15-1.91)		1.02 (0.73-1.42)	
Autres	1.09 (0.78-1.52)		0.94 (0.64-1.40)	
Période d'inclusion		<0.001		<0.001
- 2008-2011	1		1	
- 2004-2007	1.64 (1.15-2.36)		1.26 (0.85-1.89)	
- 2000-2003	3.44 (2.40-4.92)		2.84 (1.88-4.28)	

*Ajusté sur les variables du tableau

Short communication

Risk of virological failure in HIV-1-infected patients experiencing low-level viraemia under active antiretroviral therapy (ANRS C03 cohort study)

Marie-Anne Vandenhende^{1,2,3*}, Adélaïde Perrier^{1,2}, Fabrice Bonnet^{1,2,3}, Estibaliz Lazaro⁴, Charles Cazanave⁵, Sandrine Reigadas⁶, Geneviève Chêne^{1,2}, Philippe Morlat^{1,2,3}, Groupe d'Epidémiologie Clinique du SIDA en Aquitaine

¹INSERM, ISPED, Centre INSERM U897-Epidémiologie-Biostatistiques Et CIC1401-Epidémiologie Clinique, Bordeaux, France

²Université Bordeaux, ISPED, Centre INSERM U897-Epidémiologie-Biostatistique, Bordeaux, France

³Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Service de Médecine Interne et Maladies Infectieuses, Hôpital Saint-André, Bordeaux, France.

⁴Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Service de Médecine Interne et Maladies Infectieuses, Hôpital Haut-Lévêque, Pessac, France

⁵Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Pellegrin, Bordeaux, France

⁶Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Laboratoire de Virologie, Université Bordeaux, CNRS UMR 5234, Bordeaux, France

*Corresponding author e-mail: vdh.mav@gmail.com

Background: We assessed the association of persistent low-level viraemia between 50–199 copies/ml (LLV) with the risk of virological failure (VF) among HIV-1-infected patients receiving combination antiretroviral therapy (ART).

Methods: ART-naïve and ART-experienced patients followed up in the ANRS-C03 Aquitaine Cohort were included if they started two nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) with either one non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) or one protease inhibitor boosted with ritonavir (PI/r) between 2000 and 2011 and achieved viral load (VL) <200 copies/ml 4–8 months after initiating ART. VF was defined as either two consecutive VL ≥200 copies/ml or one VL ≥200 followed by a modification of ART. LLV was defined as at least two consecutive VLs between 50–199 copies/ml for at least

one month. We used Cox models to estimate the association of LLV with VF.

Results: Among 2,374 patients with a median follow-up of 3 years, 205 (8.6%) experienced LLV. LLV was strongly associated with further VF (adjusted hazard ratio [aHR] 2.30, 95% CI 1.65, 3.20). LLV was associated with VF in ART-experienced patients (aHR 3.02, 95% CI 2.10, 4.33) but not in ART-naïve patients. Neither type of ART regimen (PI/r- versus NNRTI-based regimen) nor cumulative duration of LLV was associated with VF.

Conclusions: Persistent LLV between 50–199 copies/ml was associated with VF among ART-experienced patients under ART. LLV between 50–199 copies/ml in ART-experienced patients should lead, after assessing patient's adherence and checking for drug interactions, to a closer monitoring and to consider ART optimization.

Introduction

The goal of combination antiretroviral therapy (ART) is to reach and maintain undetectable plasma HIV viral load (VL) [1]. Despite potent combination ART, 5–10% of HIV-infected patients experience persistent low-level viraemia (LLV), between 50 and 500 copies/ml [2–5]. The prognostic implications of persistent LLV on further virological failure (VF) remain uncertain [4–7], and might depend on several factors such as the level of LLV, its duration, the treatment regimen

received at the time of LLV or the ART history. Even though achieving undetectable VL remains the goal of ART, there is currently no guideline on how to manage patients experiencing LLV, especially in the range 50–199 copies/ml.

To help resolve this issue, we assessed the association of persistent LLV between 50–199 copies/ml with the risk of VF among HIV-infected patients receiving combination ART.

Methods

Study population

A retrospective analysis was performed using data of patients enrolled in the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS) CO3 Aquitaine Cohort, a hospital-based cohort of HIV-infected patients undergoing routine clinical case management [8]. ART-naïve and ART-experienced patients were eligible for the current analysis if they started an ART regimen composed of two nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) with either one non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) or one protease inhibitor (lopinavir, atazanavir or darunavir) boosted with ritonavir (PI/r) for at least 6 months; between 1 January 2000 and 31 July 2011; achieved VL<200 copies/ml within 4–8 months after ART initiation and HIV virological assays had a lower limit of quantification ≤ 50 copies/ml.

Statistical analyses

Follow-up started at the date of the lowest VL<200 copies/ml within 4–8 months after ART initiation. LLV was defined as at least two consecutive VLs between 50–199 copies/ml for at least one month after inclusion. The primary outcome was the occurrence of VF, defined as either at least two consecutive VL ≥ 200 copies/ml [9] or one VL ≥ 200 copies/ml followed by a modification of at least one drug class in the ART regimen. Patients were followed up until the occurrence of first VF, the date of the last follow-up visit or the close of the database (31 December 2011).

Patients were included in the LLV-exposed group from the first date they experienced an episode of LLV (date of the second of the two consecutive VLs between 50–199 copies/ml). Once patients were exposed to LLV, they remained in this group for the remaining follow-up time.

Baseline characteristics of patients experiencing LLV were compared with those of patients who did not experience LLV using Kruskal–Wallis tests for continuous variables and χ^2 tests for categorical variables. Kaplan–Meier survival curves were used to estimate the distributions of time to VF according to the occurrence of LLV and comparisons were made using log-rank test. We used Cox regression models to estimate hazard ratios for associations of LLV (compared to <50 copies/ml) with VF. Models were adjusted for gender, age (<30, 30–49 and ≥ 50 years), period of ART initiation (2000–2003, 2004–2007, 2008–2011), ART regimen (NNRTI- or PI/r-based regimen), history of ART (naïve or experienced), transmission group (men who have sex with men, injection drug user, heterosexual, other/unknown), AIDS stage, CD4⁺ T-cell count (0–99, 100–199, 200–349, 350–499 and ≥ 500 cells/ μ l) and VL

(<1.7, 1.7–2.9, 3–3.9, 4–4.9 and ≥ 5 log₁₀ copies/ml) at ART initiation.

Cox models restricted to patients experiencing LLV were used to estimate the association of type of ART regimen at LLV (NNRTI- or PI/r-based regimen) and cumulative duration of LLV (<3, 3–6, 6–12 and >12 months) with first VF, adjusted for same variables.

Sensitivity analyses according to the history of ART (restricted either to ART-naïve or to ART-experienced patients) were additionally performed. Stata software (version 12.0; STATA Corp., College Station, TX, USA) was used to perform the analyses.

Results

Characteristics of the patients are shown in Table 1. Among the 2,374 included patients, 205 (8.6%) experienced at least one episode of LLV with a median duration of 8.3 (IQR 5.9–13.8) months. The mean number of VL measures per year of follow-up was similar in the two groups (3.14 [95% CI 2.66, 3.67] for patients without LLV and 3.35 [2.92, 3.82] for patients with LLV). A total of 11 patients (5.4%) among the 205 who experienced LLV modified their ART regimen (at least one class of ARV) during the period of LLV (6.5% of the patients under NNRTI and 3.5% of the patients under PI/r; $P=0.364$).

During 9,059 person-years of follow-up (PYFU) with a median follow-up of 3.0 (IQR 1.3–5.4) years, 401 patients (18.5%) experienced a VF among the 2,169 without LLV, corresponding to 4.7 (95% CI 4.3, 5.2) VF per 100 PYFU and 56 (27.3%) among the 205 patients experiencing LLV, corresponding to 9.6 (7.3, 12.5) VF per 100 PYFU (10.6 [7.1, 15.6] VF per 100 PYFU and 8.9 [6.3, 12.7] VF per 100 PYFU among patients experiencing LLV under NNRTI and PI/r respectively).

Among the 457 patients experiencing VF, the median time between LLV and VF was 8.6 (IQR 3.6–22.3) months. It was 6.2 (3.0–11.2) months for patients under NNRTI at LLV and 11.3 (4.3–24.4) months for patients under PI/r at LLV ($P=0.660$).

Based on Kaplan–Meier estimates showing the cumulative incidence of VF (Figure 1), the time by which 20% of patients experienced VF was 4.6 (95% CI 3.7, 5.9) years for patients without LLV and 1.0 (0.3, 1.9) years for patients with LLV ($P<0.001$).

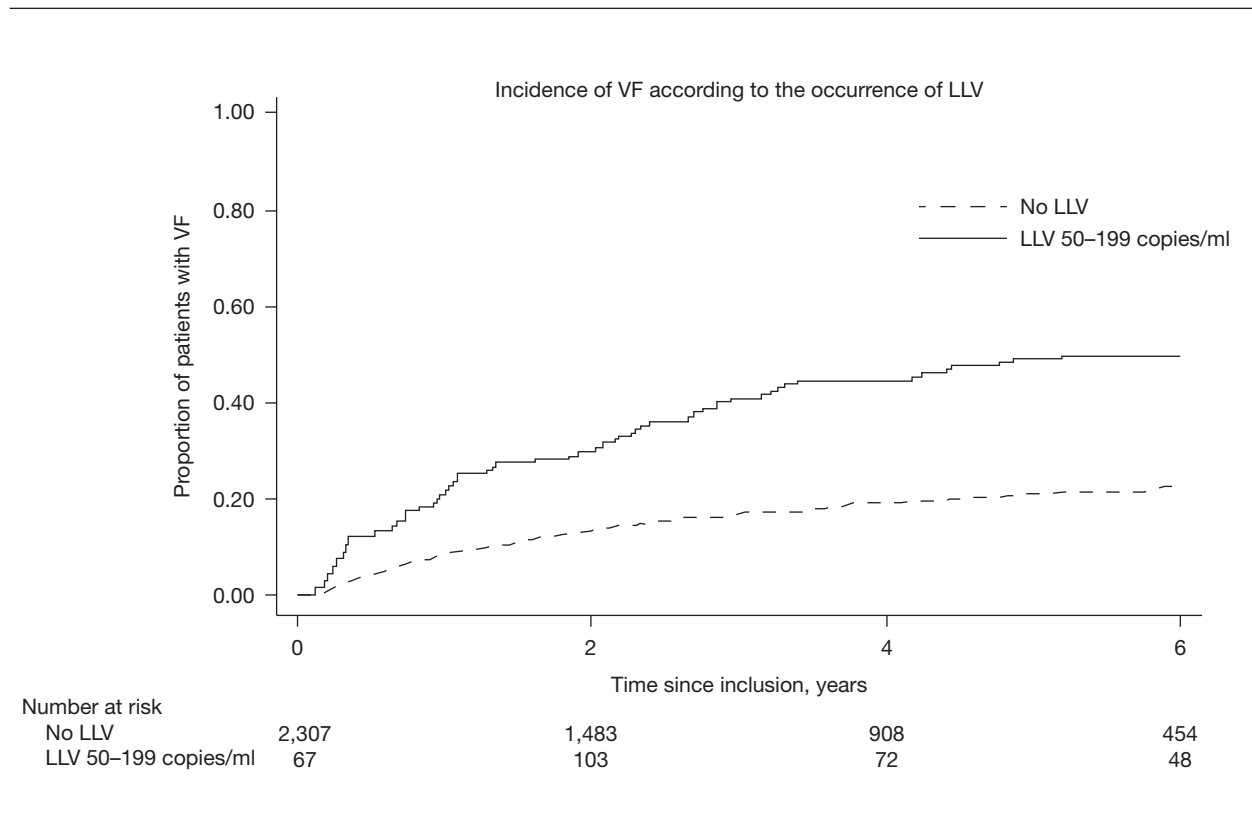
In multivariable analyses, LLV was strongly associated with VF (adjusted hazard ratio [aHR] 2.30, 95% CI 1.7, 3.20). The aHR was 3.2 (1.9, 5.4) for the 1,017 patients under NNRTI at inclusion and 1.8 (1.2, 2.8) for the 1,357 patients under PI/r at inclusion. Baseline AIDS stage, VL, history of ART, period of ART initiation, age and gender were also associated with VF. We found no association between ART regimen (PI/r-based versus NNRTI-based regimen) at inclusion and risk of VF (Table 2).

Table 1. Baseline characteristics of patients according to the occurrence of LLV ($n=2,374$)

Characteristics	No LLV ($n=2,169$; 91.4%)	LLV ^a ($n=205$; 8.6%)	P-value
Median follow-up, years (IQR)	3.1 (1.3–5.5)	2.3 (1.0–4.2)	
Gender male, n (%)	1,564 (72.1)	161 (78.5)	0.048
Median age, years (IQR)	42.6 (36.7–49.1)	41.8 (38.0–49.8)	0.493
Transmission group			0.118
MSM, n (%)	882 (40.7)	80 (39.0)	
IDU, n (%)	773 (35.6)	67 (32.7)	
Heterosexual, n (%)	325 (15.0)	43 (21.0)	
Other, n (%)	189 (8.7)	15 (7.3)	
CDC stage C, n (%)	462 (21.3)	48 (23.4)	0.527
Period of ART initiation			<0.001
2000–2003, n (%)	597 (27.5)	83 (40.5)	
2004–2007, n (%)	979 (45.2)	87 (42.4)	
2008–2011, n (%)	593 (27.3)	35 (17.1)	
Median CD4 ⁺ T-cell count, cells/ μ l (IQR)	357 (239–526)	320 (179–522)	0.078
Median VL, log ₁₀ copies/ml (IQR)	2.6 (1.7–4.6)	3.6 (1.7–5.2)	<0.001
ARV-naïve, n (%)	824 (38.0)	69 (33.7)	0.221
ART regimen			0.009
2 NRTI+1 NNRTI, n (%)	947 (43.7)	70 (34.1)	
2 NRTI+1 PI/r, n (%)	1,222 (56.3)	135 (65.9)	

^aLow-level viraemia (LLV): at least one episode of two consecutive viral loads (VLs) between 50 and 199 copies/ml. ART, antiretroviral therapy; IDU, injection drug user; MSM, men who have sex with men; NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitor; PI/r, protease inhibitor boosted with ritonavir.

[Au: please confirm title, figure and footnote are ok]

Figure 1. Incidence of VF according to the occurrence of LLV between 50–199 copies/ml (ANRS-CO3 Aquitaine Cohort, 2000–2011)

LLV, low-level viraemia; VF, virological failure.

Table 2. Crude and adjusted HRs for virological failure according to the occurrence of LLV

Characteristics	Crude HR (95% CI)	P-value	Adjusted HR ^a (95% CI)	P-value
LLV status		<0.001		<0.001
No LLV	1		1	
LLV	2.55 (1.92, 3.38)		2.30 (1.66, 3.20)	
ART at inclusion		0.069		0.160
2 NRTI+1 NNRTI	1		1	
2 NRTI+1 PI/r	1.19 (0.99, 1.43)		1.12 (0.87, 1.45)	
ARV-naïve (no versus yes)	1.67 (1.35, 2.06)	<0.001	1.77 (1.34, 2.32)	<0.001
VL at ART initiation		<0.001		<0.001
<1.7 log ₁₀ copies/ml	1		1	
1.7–2.9 log ₁₀ copies/ml	1.39 (0.98, 1.99)		1.43 (0.99, 2.05)	
3–3.9 log ₁₀ copies/ml	2.10 (1.48, 2.98)		2.05 (1.40, 2.99)	
4–4.9 log ₁₀ copies/ml	1.92 (1.45, 2.56)		2.35 (1.68, 3.29)	
≥5 log ₁₀ copies/ml	1.72 (1.27, 2.33)		2.18 (1.48, 3.22)	
CD4 ⁺ T-cell count at ART initiation		0.004		0.211
≥500 cells/μl	1		1	
350–500 cells/μl	1.01 (0.75, 1.33)		0.85 (0.62, 1.16)	
200–349 cells/μl	1.05 (0.82, 1.37)		0.85 (0.62, 1.16)	
100–199 cells/μl	1.68 (1.24, 2.27)		1.29 (0.79, 1.89)	
<100 cells/μl	1.45 (1.02, 2.04)		0.91 (0.61, 1.46)	
CDC stage C at inclusion (yes versus no)	1.38 (1.12, 1.70)	0.002	1.31 (1.01, 1.69)	0.039
Age at inclusion		<0.001		0.001
≥50 years	1		1	
30–49 years	1.67 (1.29, 2.18)		1.17 (0.87, 1.57)	
<30 years	2.53 (1.79, 3.58)		1.98 (1.34, 2.94)	
Gender (female versus male)	1.44 (1.19, 1.75)	<0.001	1.74 (1.31, 2.31)	<0.001
Transmission group		0.010		0.333
MSM	1		1	
IDU	0.98 (0.78, 1.22)		0.84 (0.58, 1.19)	
Heterosexual	1.49 (1.15, 1.91)		1.02 (0.73, 1.42)	
Other/unknown	1.09 (0.78, 1.52)		0.94 (0.64, 1.40)	
Period of ART initiation		<0.001		<0.001
2008–2011	1		1	
2004–2007	1.64 (1.15, 2.36)		1.26 (0.85, 1.89)	
2000–2003	3.44 (2.40, 4.92)		2.84 (1.88, 4.28)	

^aModels were adjusted for gender, age, period of antiretroviral therapy (ART) initiation, ART regimen, history of ART (naïve versus experienced), transmission group, AIDS stage, CD4⁺ T-cell count and viral load (VL) at ART initiation. IDU, injection drug user; LLV, low-level viraemia (at least two consecutive VLs between 50 and 199 copies/ml); MSM, men who have sex with men; NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitor; PI/r, protease inhibitor boosted with ritonavir.

In sensitivity analysis restricted to patients experiencing LLV, the type of ART regimen at LLV (PI/r versus NNRTI) was not associated with VF (aHR 0.48, 95% CI 0.17, 1.31). Furthermore, in this latter analysis, the duration of LLV (<3, 3–6, 6–12, >12 months) was also not associated with VF (data not shown).

In the sensitivity analyses restricted to ART-naïve patients, LLV was not associated with VF (aHR 0.82, 95% CI 0.36, 1.96). By contrast, LLV was strongly associated with VF in ART-experienced patients (aHR 3.02, 95% CI 2.10, 4.33). LLV had no impact on virological outcome in ART-naïve patients regardless of ART regimen at LLV (PI/r versus NNRTI) and duration of LLV (data not shown).

Discussion

In our study, 8.6% of patients under potent ART experienced LLV over a median follow-up of 3 years. The Department of Health and Human Services (USA) guidelines currently defines VF as a confirmed VL>200 copies/ml [9], but acknowledges the absence of consensus regarding which case management should be recommended for persistent LLV between 50–200 copies/ml due to the dearth of controlled comparison data.

In our study, LLV was strongly associated with VF regardless of ARV regimen (PI/r or NNRTI) and duration of LLV. Nevertheless, this association was only found in ART-experienced patients (2/3 of the study population) and not in ART-naïve patients. Some

previous large studies have already reported a higher risk of VF in patients experiencing persistent LLV between 50–500/1,000 copies/ml than in those who maintained viral suppression [4,6,7], but these studies did not provide specific information on LLV between 50–199 copies/ml. Like our study, Laprise *et al.* [5] found that persistent LLV between 50–199 copies/ml doubled the risk of VF (>1,000 copies/ml) compared with patients who maintained undetectable VL, regardless the duration of LLV. No precision was given about the proportion of ART-naïve patients in this study. An international inter-cohort study including only ART-naïve patients did not find any association between LLV 50–199 and VF (>500 copies/ml) [10].

Although there is a lower ‘genetic barrier’ to NNRTI versus PI/r, no association was found between the type of ARV regimen at LLV and VF.

The period of ART initiation was associated with VF, probably reflecting a more efficient therapeutic management of HIV-infected patients in the most recent years.

We believe that our results could be generalized to other high-income countries as the ANRS CO3 cohort includes unselected HIV-1-infected patients under routine clinical management (for example, 25% women, all routes of transmission, 30% of hepatitis C coinfection) with a high level of access to care.

Several studies have found that the occurrence of LLV in patients receiving ART may promote the selection of resistance mutations, even for LLV between 50–199 copies/ml [11–13]. LLV could also contribute to a suboptimal immune reconstitution [14], to the replenishment of latent viral reservoir [15], and might be one of the causes of persistent immune activation in HIV patients, which could contribute to mortality and chronic morbidity [16]. Further studies in the setting of large inter-cohorts including both ART-naïve and ART-experienced patients are needed to confirm our results and to assess the impact of LLV on immunological and clinical outcomes.

In conclusion, among ART-experienced patients under ART, persistent LLV between 50–199 copies/ml was strongly associated with VF. LLV between 50–199 copies/ml in ART-experienced patients should lead, after assessing patient’s adherence and checking for drugs interactions, to a closer monitoring and to consider ART optimization.

Acknowledgements

This study was supported by the Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les hépatites virales (ANRS)/ French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Contribution of authors: M-AV, PM and GC conceived the idea. M-AV and AP performed statistical analyses and GC supervised statistical analyses. M-AV did the literature search and wrote the first draft of the paper. All authors contributed to study design, collection of data, data interpretation, writing the paper and approved the final version. M-AV had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Disclosure statement

M-AV has received honoraria or travel/meeting expenses from Gilead and Janssen-Cilag. FB has received honoraria or travel/meeting expenses from Bristol-Myers Squibb, Gilead, Janssen-Cilag, Merck Sharp & Dohme-Chibret and ViiV Healthcare. GC has had scientific responsibilities in projects receiving specific grant supports that are managed through her Institution or a non-profit society: from the French Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS), the European Commission (Framework Program 7), UK Medical Research Council, US National Institute of Health (NIH), Fondation Plan Alzheimer, Abbott, Boehringer Ingelheim, Bristol-Myers Squibb, Chiron, Fit Biotech LTD, Gilead Sciences, GlaxoSmithKline, Jansen-Cilag, Merck Sharp & Dohme-Chibret, Pfizer, Roche, Tibotec and ViiV Healthcare. GC serves as Academic Editor of *PlosONE* and is on the editorial board of *BMC Infectious Diseases Journal*. PM has received honoraria or travel/meeting expenses from Bristol-Myers Squibb, Gilead, Janssen-Cilag, Merck Sharp & Dohme-Chibret and ViiV Healthcare. The remaining authors declare no competing interests.

References

- Günthard HF, Aberg JA, Eron JJ, *et al.* Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2014 recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *JAMA* 2014; 312:410–425.
- Cohen C. Low-level viremia in HIV-1 infection: consequences and implications for switching to a new regimen. *HIV Clin Trials* 2009; 10:116–124.
- García-Gascó P, Maida I, Blanco F, *et al.* Episodes of low-level viral rebound in HIV-infected patients on antiretroviral therapy: frequency, predictors and outcome. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61:699–704.
- Greub G, Cozzi-Lepri A, Ledergerber B, *et al.* Intermittent and sustained low-level HIV viral rebound in patients receiving potent antiretroviral therapy. *AIDS* 2002; 16:1967–1969.
- Laprise C, de Pokomandy A, Baril JG, Dufresne S, Trottier H. Virologic failure following persistent low-level viremia in a cohort of HIV-positive patients: results from 12 years of observation. *Clin Infect Dis* 2013; 57:1489–1496.
- Geretti AM, Smith C, Haberl A, *et al.* Determinants of virological failure after successful viral load suppression in first-line highly active antiretroviral therapy. *Antivir Ther* 2008; 13:927–936.

7. Sungkanuparph S, Groger RK, Overton ET, Fraser VJ, Powderly WG. Persistent low-level viraemia and virological failure in HIV-1-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy. *HIV Med* 2006; 7:437–441.
8. Thiébaud R, Morlat P, Jacqmin-Gadda H, *et al.* Clinical progression of HIV-1 infection according to the viral response during the first year of antiretroviral treatment. Groupe d'Epidémiologie du SIDA en Aquitaine (GECSA). *AIDS* 2000; 14:971–978.
9. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services (Updated 13 November 2014. Accessed 16 November 2014.) Available from <http://www.aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adultandadolescentgl.pdf>
10. Vandenhende M, Ingle S, May M, *et al.* Impact of low-level viremia on clinical and virological outcomes in treated HIV-1 infected patients. *AIDS* 2015; 29:373–383.
11. Delaunay C, Gallien S, Flandre P, *et al.* Impact of low-level-viremia on HIV-1 drug-resistance evolution among antiretroviral treated-patients. *PLoS ONE* 2012; 7:e36673.
12. Swenson LC, Min JE, Woods CK, *et al.* HIV drug resistance detected during low-level viraemia is associated with subsequent virologic failure. *AIDS* 2014; 28:1125–1134.
13. Taiwo B, Gallien S, Aga E, *et al.* Antiretroviral drug resistance in HIV-1-infected patients experiencing persistent low-level viremia during first-line therapy. *J Infect Dis* 2011; 204:515–520.
14. Corbeau P, Reynes J. Immune reconstitution under antiretroviral therapy: the new challenge in HIV-1 infection. *Blood* 2011; 117:5582–5590.
15. Ramratnam B, Mittler JE, Zhang L, *et al.* The decay of the latent reservoir of replication-competent HIV-1 is inversely correlated with the extent of residual viral replication during prolonged anti-retroviral therapy. *Nat Med* 2000; 6:82–85.
16. Hunt PW. HIV and inflammation: mechanisms and consequences. *Curr HIV/AIDS Rep* 2012; 9:139–147.

Accepted 17 February 2015; published online 4 March 2015

D. IMPACT PRONOSTIQUE D'UNE CHARGE VIRALE DE FAIBLE NIVEAU PERSISTANTE SUR L'EVOLUTION VIROLOGIQUE (INTER-COHORTE ART-CC, 1997-2012)

I. Objectif – Méthodologie de l'étude

Compte-tenu des résultats observés dans notre étude réalisée au sein de la Cohorte Aquitaine, nous avons réalisé une étude complémentaire au sein de la cohorte ART-CC en reprenant les mêmes critères d'inclusion, mais en modifiant les critères de définition de l'EV. Nous nous sommes donc focalisés sur les CVF50-200 avec comme évènement d'intérêt la survenue d'un EV défini par $2\text{ CV} \geq 200\text{ copies/ml}$ (ou $1\text{ CV} \geq 200\text{ copies/ml}$ suivie d'une modification du régime thérapeutique) avec la même méthodologie que la première étude (partie B):

- Patients inclus dans le groupe « CVF50-200 » à partir du début du premier épisode de CVF50-200. Une fois qu'un patient était exposé à la survenue d'une CVF50-200, il restait dans ce groupe jusqu'à la fin du suivi.
- Analyse du délai de survenue de l'EV $\geq 200\text{ copies/ml}$ avec réalisation d'une courbe de survie de Kaplan-Meyer et utilisation du test de Log-rank pour comparer les groupes.
- Réalisation d'une analyse univariée puis multivariée selon le modèle de Cox de la survenue d'un EV $\geq 200\text{ copies/ml}$ avec comme variable principale d'intérêt la survenue d'une CVF50-200, ajustée sur les mêmes variables (âge sexe, période d'inclusion, type de régime thérapeutique, groupe de transmission présumé, stade de la classification CDC, taux médian de CD4 et CV à l'initiation du traitement ARV).
- Analyse de sensibilité restreinte aux patients ayant présenté une CVF 50-200 pour étudier l'association entre la durée de la CVF50-200, le type de régime thérapeutique

lors de la CVF et son éventuelle modification durant la CVF avec la survenue d'un EV ≥ 200 copies/ml.

- Réalisation d'une analyse supplémentaire univariée puis multivariée selon le modèle de Cox de la survenue d'un EV défini par $2\text{ CV} \geq 500$ copies/ml (ou $1\text{ CV} \geq 500$ copies/ml suivie d'une modification du régime thérapeutique) avec comme variable principale d'intérêt la survenue d'une CVF50-200, ajustée sur les mêmes variables

Nous avons de plus réalisé une analyse univariée puis multivariée par un modèle de régression logistique pour déterminer les facteurs de risque associés à la survenue d'une CVF50-200.

II. Résultats

1. Population de l'étude et caractéristiques des CVF50-200

Parmi les 17902 patients inclus, 756 (4.2%) ont présenté au moins un épisode de CVF50-200 avec une durée médiane de 5.9 mois (IQR: 3.4-8.8) et une médiane de CV durant la CVF50-200 à 91 copies/ml (IQR 73-112). Les caractéristiques des patients inclus selon leur exposition ou non à une CVF50-200 au cours du suivi sont présentées dans le Tableau 13.

Parmi les 756 patients ayant présenté une CVF50-200, 78 (10.3%) ont modifié leur régime thérapeutique (au moins une classe d'ARV) durant la période de CVF50-200 (9.2% des patients sous INNTI et 8.3% des patients sous IP/r, $p=0.682$). Parmi les 78 patients ayant modifié leur traitement ARV durant la CVF50-200, 14.1% % avaient une $\text{CV} \geq 200$ copies/ml au décours de la CVF versus 13.9% des patients n'ayant pas modifié leur traitement ($p=0.967$). Ces résultats étaient similaires quel que soit le régime thérapeutique au début de la CVF (INNTI ou IP/r).

Dans l'analyse multivariée par régression logistique des facteurs de risque de CVF50-200, le type de régime thérapeutique ($2\text{INTI}+1\text{IP/r}$ versus $2\text{INTI}+1\text{INNTI}$), la CV à l'initiation du

traitement ($CV > 5 \log$ et $CV > 4.5 \log$ versus $CV < 4.5 \log$), l'âge (âge > 50 ans versus âge entre 30 et 50 ans et âge < 30 ans), le sexe (masculin versus féminin), la période d'inclusion (1997-2002 versus 2003-2006 et 2007-2011) et la région (Canada et USA versus Europe) étaient associés à un risque plus élevé de survenue d'une CVF50-200. Le taux de CD4 à l'initiation du traitement, le stade C et le groupe de transmission (UDI et hétérosexuelle versus HSH) n'étaient pas associés à un risque plus élevé de survenue de CVF50-200 (Tableau 14).

Tableau 13: Caractéristiques des patients à l'inclusion (N=17902)

	Pas de CVF n=17146 (95.8%)	CVF50-200 n=756 (4.2%)	p-value
Durée médiane de suivi, années (IQR)	2.3 (1.0-4.3)	1.6 (0.6-3.1)	
Sexe masculin, n (%)	12930 (75.4%)	615 (81.4%)	<0.001
Age médian, années (IQR)	39 (32-46)	40 (34-49)	<0.001
Groupe de transmission, n (%)			<0.001
HSH	7160 (41.8%)	319 (42.2%)	
UDI	1487 (8.7%)	72 (9.5%)	
Hétérosexuelle	6467 (37.7%)	239 (31.6%)	
Autre/inconnu	2032 (11.8%)	126 (16.7%)	
Stade C, n (%)	2896 (16.9%)	176 (23.3%)	<0.001
Taux de CD4, n (%)			<0.001
Médian, cellules/mm ³ (IQR)	230 (130-316)	190 (98-280)	
<50 cellules/mm ³	1932 (11.3%)	108 (14.3%)	
50-199 cellules/mm ³	5062 (29.5%)	282 (37.3%)	
200-349 cellules/mm ³	7027 (41.0%)	255 (33.7%)	
≥350 cellules/mm ³	3125 (18.2%)	111 (14.7%)	
CV VIH (log₁₀ cp/ml), n (%)			<0.001
Médiane, log ₁₀ cp/ml (IQR)	4.8 (4.3-5.2)	5.0 (4.7-5.5)	
<4.5 log ₁₀	5709 (33.3%)	133 (17.6%)	
4.5-5 log ₁₀	4515 (26.3%)	173 (28.9%)	
>5 log ₁₀	6922 (40.4%)	450 (59.5%)	
Traitement ARV, n (%)			<0.001
2NRTI+1NNRTI	10185 (59.4%)	331 (43.8%)	
2NRTI+1PI/r	6961 (40.6%)	425 (56.2%)	
Période d'inclusion, n (%)			<0.001
1997-2002	2829 (16.5%)	147 (19.4%)	
2003-2006	6978 (40.7%)	356 (47.1%)	
2007-2011	7339 (42.8%)	253 (33.5%)	
Régions, n (%)			<0.001
Europe	14496 (84.6%)	555 (73.4%)	
Canada	1792 (10.4%)	147 (19.4%)	
USA	858 (5.0%)	54 (7.2%)	

CVF : Charge virale de faible niveau persistante, CV : charge virale, IQR: interquartile range, ARV: Antirétroviral, HSH: homme ayant des relations sexuelles avec des hommes, UDI : usager de drogues intraveineuses, INTI : inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse, INNTI : inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse, IP/r: inhibiteur de protéase boosté par du ritonavir

Tableau 14: Analyses univariées et multivariées par régression logistique des facteurs de risque de survenue d'une CVF50-200 (Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration 1997-2011)

Caractéristiques	OR (IC 95%)	p-value	OR ajusté (IC 95%)	p-value
Traitement ARV à l'inclusion		<0.001		<0.001
- 2INTI+1INNTI	1		1	
- 2INTI+1IP/r	2.09 (1.71-2.54)		2.11 (1.72-2.59)	
CV à l'initiation des ARV		<0.001		<0.001
- <4.5 log10 copies/ml	1		1	
- 4.5-5 log10 copies/ml	1.80 (1.35-2.42)		1.72 (1.28-2.31)	
- >5 log10 copies/ml	2.97 (2.30-3.83)		2.56 (1.96-3.34)	
Taux de CD4 à l'initiation des ARV		<0.001		0.567
- <50 cellules/mm ³	1		1	
- -50-199 cellules/mm ³	0.92 (0.68-1.25)		1.22 (0.89-1.70)	
- 200-349 cellules/mm ³	0.63 (0.47-0.85)		1.08 (0.77-1.53)	
- ≥350 cellules/mm ³	0.62 (0.44-0.88)		1.05 (0.71-1.54)	
Stade C à l'inclusion (Oui vs Non)	1.54 (1.22-1.94)	<0.001	1.20 (0.92-1.55)	0.178
Age à l'inclusion (années)		<0.001		0.001
- <30	1		1	
- 30-50	1.33 (0.99-1.79)		1.21 (0.90-1.65)	
- >50	2.12 (1.52-2.96)		1.83 (1.30-2.58)	
Sexe (masculin vs féminin)	1.56 (1.22-2.00)	<0.001	1.36 (1.02-1.82)	0.034
Groupe de transmission		0.001		0.197
- HSH	1		1	
- UDI	0.99 (0.69-1.41)		1.00 (0.69-1.44)	
- Hétérosexuelle	0.83 (0.66-1.04)		0.91 (0.70-1.18)	
- Autre/inconnu	1.56 (1.19-2.05)		1.53 (1.16-2.04)	
Période d'inclusion		0.585		0.092
- 2007-2011	1		1	
- 2003-2006	1.09 (0.89-1.34)		1.01 (0.82-1.25)	
- 1997-2002	1.15 (0.82-1.62)		1.43 (1.00-2.04)	
Régions, n (%)		<0.001		<0.001
- Europe	1		1	
- Canada	2.21 (1.73-2.84)		2.00 (1.50-2.68)	
- USA	1.63 (1.13-2.35)		1.77 (1.20-2.60)	

CVF : Charge virale de faible niveau persistante, IC : intervalle de confiance, OR : odds ratio (ajusté sur les variables du tableau), CV : charge virale, ARV: Antirétroviral, HSH: homme ayant des relations sexuelles avec des hommes, INTI : inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse, INNTI : inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse, IP/r: inhibiteur de protéase boosté par du ritonavir

2. Evolution virologique : survenue d'un EV ≥ 200 copies/ml

Durant 54222 PA avec un suivi médian de 2.2 ans (IQR: 1.0-4.2) :

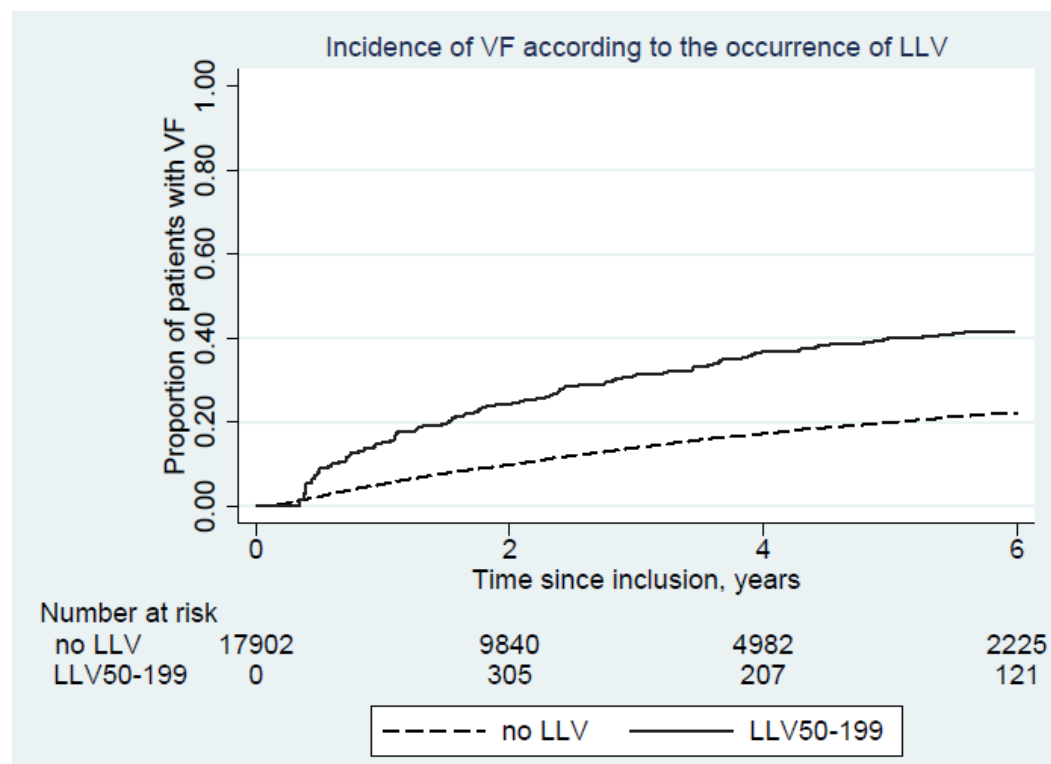
- 2392 patients (14.0%) ont présenté un échec virologique (EV) parmi les 17146 du groupe « pas de CVF », correspondant à 4.5 (IC 95%: 4.4-4.7) EV pour 100PA
- 124 patients (16.4%) ont présenté un EV parmi les 756 du groupe « CVF50-200 », correspondant à 8.2 (6.9-9.8) EV pour 100PA (9.3 [7.3-11.9] EV pour 100PA pour les patients sous INNTI et 7.3 [5.7-9.4] EV pour 100PA pour les patients sous IP/r lors de la CVF50-200).

Parmi les 124 patients présentant une CVF50-200 suivie d'un EV, le délai médian entre la survenue de la CVF50-200 et l'EV était de 7.2 mois (IQR 3.4-18.0). Ce délai était de 6.3 mois (3.4-17.5) pour les 54 patients sous INNTI lors de la CVF50-200 et de 9.6 mois (3.3-23.2) pour les 51 patients sous IP/r lors de la CVF50-200 ($p=0.486$).

L'analyse de survenue d'un EV par courbes de survie de Kaplan-Meier (selon la survenue d'une CVF50-200) est présentée Figure 10. Le délai pour que 10% des patients présentent un EV était de 2.0 ans (IC 95%: 1.9-2.1) pour les patients du groupe « pas de CVF » et de 0.6 an (0.3-1.0) pour les patients du groupe « CVF50-200 » ($p<0.001$). Le délai pour que 20% des patients présentent un EV était de 5.1 ans (IC 95%: 4.7-5.4) pour les patients du groupe « pas de CVF » et de 1.5 ans (0.7-2.3) pour les patients du groupe « CVF50-200 » ($p<0.001$).

Parmi les patients du groupe « pas de CVF », 5.3% (IC 95%: 5.0-5.7) étaient en EV à 1 an et 9.9% (IC 95%: 9.4-10.4) à 2 ans. Parmi les patients exposés à une CVF50-200, 15.4% (IC 95%: 10.0-23.3) étaient en EV à 1 an et 24.2% (IC 95%: 18.4-31.6) à 2 ans.

Figure 10: Incidence de l'échec virologique selon la survenue d'une CVF50-200 - Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration 1997-2011



Dans les analyses multivariées selon le modèle de Cox (Tableau 15), la survenue d'une CVF50-200 était fortement associée à la survenue d'un EV (HRa: 2.4, IC 95%: 1.9-3.0). Le HRa était de 3.1 (2.3-4.2) pour les 10516 patients sous INNTI à l'inclusion et de 2.0 (1.4-2.8) pour les 7386 patients sous IP/r à l'inclusion. L'âge, le sexe, la période d'inclusion, le stade C à la date d'inclusion et le groupe de transmission étaient également fortement associés à la survenue d'un EV. Aucune association significative n'a été mise en évidence entre le type de régime thérapeutique à l'inclusion (IP/r versus INNTI) et la survenue d'un EV.

Dans l'analyse multivariée de sensibilité restreinte aux patients ayant présenté une CVF50-200, le type de régime thérapeutique lors de la CVF50-200 (IP/r versus INNTI) n'était pas associé à la survenue d'un EV (HRa: 0.9, IC 95%: 0.5-1.5). La modification du traitement ARV durant la CVF50-200 n'avait pas d'impact sur le risque de survenue d'un EV. De plus, dans cette

analyse, la durée de CVF50-200 (<3, 3-6, 6-12, >12 mois) n'était également pas associée à un risque plus élevé d'EV.

Dans l'analyse multivariée de sensibilité comparant aux patients ayant présenté une CVF50-200 les patients dont l'ensemble des CV entre l'inclusion et l'EV (ou le dernier suivi) était inférieure à 50 copies/ml, la survenue d'une CVF50-200 était également fortement associée à la survenue d'un EV (HRa : 2.6, IC 95%: 2.0-3.4).

Une analyse complémentaire a été réalisée avec comme événement d'intérêt la survenue d'un EV défini par 2 CV \geq 500 copies/ml (ou 1 CV \geq 500 copies/ml suivie d'une modification du régime thérapeutique). Celle-ci retrouve une forte association entre la survenue d'une CVF50-200 et la survenue d'un EV \geq 500 copies/ml (HRa : 1.7, IC 95%: 1.2-2.2).

Cette étude fera l'objet d'un manuscrit.

Tableau 15: Analyses univariées et multivariées selon le modèle de Cox de la survenue d'un échec virologique (2 CV \geq 200 copies/ml) selon la survenue d'une CVF (Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration 1997-2011)

Caractéristiques	HR (IC95%)	p-value	HR ajusté (IC95%)	p-value
CVF		<0.001		<0.001
- pas de CVF	1		1	
- CVF50-200	2.38 (1.92-2.96)		2.41 (1.93-3.00)	
Traitement ARV		0.069		0.210
- 2INTI+1INNTI	1		1	
- 2INTI+1IP/r	1.09 (0.99-1.24)		1.17 (0.92-1.34)	
CV à l'initiation des ARV		0.087		0.920
- <4.5 log10 copies/ml	1		1	
- 4.5-5 log10 copies/ml	0.90 (0.79-1.02)		0.99 (0.87-1.13)	
- >5 log10 copies/ml	0.88 (0.79-0.99)		0.97 (0.86-1.10)	
Taux de CD4 à l'initiation des ARV		0.004		0.466
- <50 cellules/mm3	1		1	
- -50-199 cellules/mm3	0.82 (0.70-0.95)		0.93 (0.80-1.10)	
- 200-349 cellules/mm3	0.69 (0.60-0.81)		0.87 (0.73-1.03)	
- \geq 350 cellules/mm3	0.90 (0.73-1.20)		1.10 (0.90-1.36)	
Stade C à l'inclusion (Oui vs Non)	1.23 (1.10-1.39)	<0.001	1.23 (1.07-1.40)	0.003
Age à l'inclusion (années)		<0.001		<0.001
- >50	1		1	
- 30-50	1.37 (1.17-1.59)		1.39 (1.18-1.62)	
- <30	2.25 (1.89-2.67)		2.18 (1.82-2.61)	
Sexe (féminin vs masculin)	1.60 (1.44-1.77)	<0.001	1.15 (1.02-1.31)	0.024
Groupe de transmission		<0.001		<0.001
- HSH	1		1	
- UDI	2.14 (1.81-2.53)		1.95 (1.62-2.33)	
- Hétérosexuelle	1.82 (1.62-2.04)		1.49 (1.29-1.71)	
- Autres	1.48 (1.27-1.75)		1.33 (1.11-1.59)	
Période d'inclusion		<0.001		<0.001
- 2007-2011	1		1	
- 2003-2006	1.24 (1.09-1.43)		1.11 (0.96-1.29)	
- 1997-2002	1.81 (1.56-2.11)		1.58 (1.34-1.86)	

Ajusté sur les variables du tableau et stratifié par cohorte

CVF : Charge virale de faible niveau persistante, IC : intervalle de confiance, HR : hazard ratio, CV : charge virale, ARV: Antirétroviral, HSH: homme ayant des relations sexuelles avec des hommes, UDI : usager de drogues intraveineuses, INTI : inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse, INNTI : inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse, IP/r: inhibiteur de protéase boosté par du ritonavir

E. DISCUSSION

Prévalence des CVF

Dans nos études de cohorte, 4 à 9% des patients sous traitement ARV ont présenté au moins un épisode de CVF (6.2% de CVF entre 50 et 500 copies/ml dans l'étude conduite dans ART-CC et 8.6% de CVF entre 50 et 200 copies/ml dans l'étude conduite dans Aquitaine). La prévalence plus élevée dans l'étude conduite dans la cohorte Aquitaine s'explique par des critères d'inclusion différents, les patients devant avoir une CV < 200 copies/ml dans les 4-8 mois après le début du traitement ARV dans l'étude conduite dans la cohorte Aquitaine (et certains patients présentaient un épisode de CVF dès l'inclusion), alors que cette CV devait être inférieure à 50 copies/ml dans l'étude conduite dans ART-CC. Cette prévalence est cohérente avec celle rapportée dans la littérature, où plusieurs études précédentes décrivent une prévalence de CVF entre 50 et 500 copies/ml parmi des patients sous ARV de l'ordre de 4 à 10% [26-29].

Facteurs de risque de CVF50-200

Le risque de présenter une CVF50-200 était plus élevé parmi les patients sous traitement par IP/r que parmi les patients sous INNTI dans les études conduites dans Aquitaine et ART-CC. D'autres études ont également rapporté une probabilité plus élevée de présenter une CVF en cas de régime thérapeutique avec IP/r en comparaison aux INNTI [103-106]. Ceci pourrait être secondaire à plusieurs facteurs, comme des profils de tolérance différents ce qui pourrait influencer l'observance, ou des propriétés pharmacocinétiques différentes avec une moindre diffusion dans certains compartiments anatomiques sanctuaires. Il faut toutefois souligner un biais potentiel résultant du fait que de nombreux cliniciens vont privilégier en cas de risque de mauvaise observance l'utilisation d'IP/r de façon préférentielle aux INNTI pour diminuer le risque de sélection de mutations de résistance.

Une CV élevée à l'initiation du traitement ARV était également associée à la survenue d'une CVF dans nos études, comme précédemment rapporté dans la littérature [104,105,107]. Une des hypothèses est que plus la CV initiale pré-thérapeutique est élevée, plus le réservoir de cellules infectées par le VIH est important, conduisant à un relargage de virus plus important en cas d'activation cellulaire, et à un risque plus important de persistance de la réplication virale à un faible niveau dans certains sanctuaires anatomiques. Le sexe masculin et un âge > 50 ans étaient associés à un risque plus élevé de CVF50-200 dans l'étude conduite dans ART-CC, avec une tendance similaire mais non significative dans celle conduite dans la cohorte Aquitaine, cette différence pouvant être secondaire à un manque de puissance lié à un effectif plus faible dans cette dernière étude. Les résultats sont discordants dans la littérature avec certaines études retrouvant une association entre sexe masculin et risque de CVF [105] et d'autres non [104,107]. Aucune explication n'a été clairement apportée, une des hypothèses pouvant être évoquée étant que la concentration d'ARV serait plus élevée chez les femmes [108]. L'historique de traitement (patients pré-traités en comparaison aux patients naïfs à l'inclusion) était associé à un risque plus élevé de CVF50-200 dans l'analyse restreinte aux patients ayant une CV <50 copies/ml à l'inclusion, cette association étant également rapportée dans la seule étude ayant étudié ce facteur de risque [105]. Le taux de CD4 à l'initiation du traitement, le stade C et le groupe de transmission (UDI et hétérosexuelle versus HSH) n'étaient pas associés à un risque plus élevé de survenue de CVF50-200. L'ensemble des CV étaient mesurées par une technique virologique ayant une limite inférieure de quantification de la CV < 50 copies/ml. Néanmoins, le manque de données précises concernant la technique virologique utilisée et la variation des techniques utilisées au cours du temps notamment chez un même patient ne nous a pas permis d'évaluer le risque de CVF50-200 selon le type de technique virologique utilisée pour la quantification de la CV.

Impact virologique des CVF

Impact selon le niveau et la durée de la CVF

Dans l'analyse initiale conduite dans la cohorte ART-CC (impact de la survenue d'une CVF (CVF50-200 et CVF200-500) sur le risque d'EV ≥ 500 copies/ml) portant sur 17902 patients avec un suivi médian de 2.3 ans, nous avons retrouvé que seule la survenue d'une CVF200-500 était fortement associée à la survenue d'un EV (HRa: 3.97, IC 95%: 3.05-5.17). A l'opposé, la survenue d'une CVF50-200 n'était pas associée significativement à la survenue d'un EV (HRa: 1.38, IC 95%: 0.96-2.00).

Dans notre étude conduite dans la cohorte Aquitaine (impact de la survenue d'une CVF50-200 sur le risque d'EV ≥ 200 copies/ml) portant sur 2374 patients avec une durée médiane de suivi de 3 ans, nous avons mis en évidence que la survenue d'une CVF50-200 était fortement associée à la survenue d'un EV ≥ 200 copies/ml (HRa 2.3, IC95% : 1.7-3.2).

Les résultats différents de ces 2 études peuvent sans doute s'expliquer en partie par des considérations méthodologiques. Dans l'étude ART-CC, les CVF200-500 étaient définies par la survenue d'au moins 2 CV consécutives entre 50 et 499 copies/ml dont au moins une entre 200 et 499 copies/ml (nous avons décidé de classer les patients présentant des CV consécutives oscillant entre 50-200 et 200-500 dans le groupe « 200-500 », considéré comme le groupe à plus haut risque). Nous avons mis en évidence que parmi les patients classés dans le groupe « CVF200-500 », 69% avaient plus de la moitié de leurs CV comprises entre 50 et 199 copies/ml durant la CVF200-500. Il en résultait ainsi une diminution artificielle de l'impact potentiel des CVF50-200 puisque ces patients étaient classés dans le groupe « CVF200-500 ». En diminuant le seuil de l'EV à 200 copies/ml dans l'étude Aquitaine, nous avons pu éviter ce biais de classification en nous focalisant uniquement sur les CVF50-200. Dans l'analyse complémentaire conduite dans ART-CC portant également sur l'impact des CVF50-200 sur la survenue d'un EV ≥ 200 copies/ml, nous avons retrouvé que la survenue d'une CVF50-200

était fortement associée à la survenue d'un EV (HRa: 2.4, IC 95%: 1.9-3.0), confirmant les données de l'étude conduite dans la Cohorte Aquitaine.

Dans l'ensemble des analyses réalisées, l'association d'une CVF à un risque plus élevé d'EV était retrouvée quelle que soit la durée de la CVF (de 1 à 3 mois, 3 à 6 mois, 6 à 12 mois ou plus de 12 mois).

- La survenue d'une CVF200-500 est significativement associée à un risque 4 fois plus élevé de survenue d'un EV ≥ 500 copies/ml. La survenue d'une CVF50-200 est significativement associée à un risque plus de 2 fois plus élevé de survenue d'un EV ≥ 200 copies/ml, et ce quelle que soit la durée de la CVF.

Dans la littérature, peu de grandes études portent sur l'impact des CVF sur le risque d'EV, particulièrement sur l'impact des CVF50-200. Plusieurs auteurs rapportent une association entre la survenue d'une CVF et un risque plus élevé d'EV [28,29,109-111]. Greub *et al.* rapportent dans une étude portant sur 2055 patients une forte association entre la survenue d'une CVF persistante entre 50-500 copies/ml (7.5% des patients) et la survenue d'un EV ≥ 500 copies/ml avec un HR à 5.8 (IC95%: 4.3-7.9) en comparaison avec les patients avec une CV <50 copies/ml [28]. Dans une étude portant sur 1386 patients, Geretti *et al.* ont mis en évidence un risque plus élevé d'EV ≥ 400 copies/ml en cas d'exposition à une CVF entre 50 et 400 copies/ml [111]. Ces études ne fournissaient toutefois pas d'informations spécifiques sur les CVF entre 50 et 200 copies/ml. Dans une étude portant sur 1860 patients, Laprise *et al.* retrouvent un risque d'EV ≥ 1000 copies/ml plus de 2 fois plus élevé en cas d'exposition à une CVF entre 50-200 copies/ml, et ce quelle que soit la durée de la CVF (6-9 mois, 9-12 mois ou ≥ 12 mois), avec une incidence cumulée d'EV à 1 an de 22.7% dans le groupe « CVF50-200 » versus 6.6% dans le groupe « pas de CVF », soit des résultats similaires à ceux retrouvés dans nos études [29]. Aucune analyse n'a été réalisée sur l'impact des CVF50-200 selon le type de régime

thérapeutique ou l'historique de traitement ARV à l'inclusion (naïf versus non-naïf) dans l'étude de Laprise *et al.*

Impact virologique selon l'historique de traitement

Dans l'étude conduite dans la cohorte Aquitaine portant sur 2374 patients, 893 patients étaient naïfs de traitement ARV à l'inclusion. Parmi eux, 105 patients (12.7%) ont présenté un EV parmi les 824 patients du groupe « pas de CVF » et 7 patients (10.1%) parmi les 69 patients du groupe « CVF50-200 ». Dans l'analyse de sensibilité restreinte à ces patients naïfs à l'inclusion, la survenue d'une CVF50-200 n'était plus associée à un risque plus élevé d'EV (HRa: 0.8, IC 95%: 0.4-2.0). A l'opposé, la survenue d'une CVF50-200 était fortement associée à un surrisque d'EV chez les patients non-naïfs de traitement ARV à l'inclusion (HRa: 3.02, IC 95%: 2.10-4.33). Dans l'étude conduite dans la cohorte ART-CC, seuls les patients naïfs de traitement étaient inclus dans l'étude. Or, nous avons mis en évidence dans cette étude que la survenue d'une CVF200-500 était fortement associée à la survenue d'un EV (HRa: 2.4, IC 95%: 1.9-3.0). Cette différence s'explique probablement par un manque de puissance de l'étude conduite dans la cohorte Aquitaine lié au faible effectif de patients naïfs présentant une CVF50-200.

- La survenue d'un CVF50-200 est donc significativement associée à un risque plus de 2 fois plus élevé de survenue d'un EV ≥ 200 copies/ml, que les patients soient sous une première ligne de traitement ARV ou non.

Impact selon le traitement lors de la CVF

Aucune association n'a été mise en évidence entre le type de régime thérapeutique lors de la CVF (IP/r versus INNTI) et le risque d'échec virologique, aussi bien dans les études portant sur l'impact des CVF50-200 et le risque d'EV ≥ 200 copies/ml que dans l'étude portant sur l'impact des CVF200-500 et le risque d'EV ≥ 500 copies/ml. Le délai entre la survenue d'une CVF et la survenue d'un EV n'était pas statistiquement différent que les patients soient sous INNTI (délai médian de 6 mois, IQR : 3-18) ou sous IP/r (délai médian de 9 à 11 mois, IQR : 3-24).

Le pourcentage de patients exposés à une CVF50-200 dont le traitement a été modifié durant la CVF50-200 était similaire que les patients soit sous INNTI ou sous IP/r au début de la CVF. Parmi ceux exposés à une CVF200-500, le pourcentage de patients modifiant leur traitement durant la CVF200-500 était plus élevé chez les patients sous INNTI que sous les patients sous IP/r.

Dans l'étude menée dans ART-CC, la modification du traitement ARV durant la CVF50-200 ne diminuait pas le risque d'EV ≥ 200 copies/ml, mais il faut noter que le pourcentage de patients ayant une CV<50 copies/ml après la CVF50-200 était similaire que les patients aient ou non modifié leur traitement ARV durant la CVF. Dans l'étude menée dans la cohorte Aquitaine, les 11 patients ayant modifié leur traitement durant la CVF avaient de nouveau une CV<50 copies/ml après la CVF et aucun d'entre eux n'a présenté d'EV au cours du suivi. Nous ne disposons malheureusement pas des raisons ayant incité les cliniciens à modifier ou non le traitement ARV de leurs patients. L'absence notamment de données sur l'observance, la tolérance, de dosages pharmacologiques, de données de résistance aux ARV dans nos différentes études ne nous ont pas permis de prendre en compte dans nos analyses ces facteurs de risque majeurs d'échecs virologiques, et qui peuvent en partie expliquer les résultats discordants entre nos 2 études sur l'impact d'une modification des ARV durant un épisode de CVF sur l'évolution virologique ultérieure.

Il n'existe que très peu de données dans la littérature sur l'impact de la modification du régime thérapeutique durant la CVF sur le risque d'échec virologique à long terme. Boillat-Blanco *et al.* rapportent que parmi 113 patients ayant présenté une CVF entre 21 et 400 copies/ml, 74% des patients ayant modifié leur traitement avaient une CV indétectable à 48 semaines versus 26% des patients n'ayant pas modifié leur traitement [110]. Dans leur étude portant sur 92 patients ayant présenté une CVF entre 20 et 1000 copies/ml, McConnell *et al.* rapportent que parmi les 41 patients ayant modifié leur traitement (en se basant sur les résultats du test génotypique de résistance lors de la CVF), 73.2% avaient une CV < 20 copies/ml à 6 mois versus 11.8% des 51 patients n'ayant pas modifié leur traitement [86]. Wirden *et al.* décrivent que parmi les 53 patients présentant des MR lors de la CVF50-1000, 70% des patients ayant optimisé leur traitement avaient une CV indétectable versus 33% des patients n'ayant pas modifié leur traitement [112]. Parmi les patients ayant un virus sensible aux ARV lors de la CVF, le pourcentage de patients ayant une CV indétectable était similaire que les patients aient ou non modifié leur traitement (58% versus 53%), sauf en cas d'augmentation des posologies d'IP/r où les 6 patients concernés avaient de nouveau une CV indétectable (dont 4 patients avec des dosages initiaux insuffisants).

- La survenue d'un CVF50-200 est donc significativement associée à un risque plus de 2 fois plus élevé de survenue d'un EV ≥ 200 copies/ml, que les patients soient sous trithérapie comportant un IP/r ou un INNTI. La modification du traitement ARV en cas de survenue de CVF a probablement un impact favorable sur le risque de survenue d'un EV notamment en cas de mutations de résistance, tout en renforçant l'observance et en éliminant une origine pharmacologique (interactions médicamenteuses ou malabsorption).

Autres facteurs associés à un risque plus élevé d'EV

Le sexe féminin était associé à un plus grand risque d'EV dans nos études. Une des explications possibles serait un taux plus élevé d'effets secondaires des ARV dans la population féminine avec une moins bonne observance [113,114]. Après ajustement sur l'observance au traitement, la réponse virologique sous traitement ARV apparaît en effet similaire dans la population féminine [114]. Un âge > 50 ans était également associé à un plus faible risque d'EV en comparaison aux populations plus jeunes, comme précédemment rapporté par la littérature, et probablement en rapport avec une meilleure observance du traitement ARV [115,116]. La période d'inclusion avait également un impact avec une diminution du risque d'échec virologique dans les périodes les plus récentes, reflétant l'amélioration de la prise en charge thérapeutique des PVVIH ces dernières années. Le développement de molécules plus puissantes et mieux tolérées et l'amélioration des associations thérapeutiques ont en effet permis une diminution au fil du temps du taux d'échec virologique [2-4].

CVF et résistance aux ARV

La persistance d'une réplication virale sous ARV expose à la sélection de mutations de résistance (MR) aux ARV. Plusieurs études rapportent en effet que la survenue d'une CVF entre 50 et 500 copies/ml entraîne la sélection de MR aux ARV, y compris pour les CVF50-200 et vis-à-vis de toutes les classes d'ARV, avec toutefois un risque plus faible en cas de traitement comportant un IP/r, et donc en conséquence une diminution des options thérapeutiques futures [104,117-122]. Delaugerre *et al.* ont ainsi mis en évidence que parmi 48 patients présentant un épisode de CVF compris entre 50 et 500 copies/ml (CV médiane de 134 copies/ml), 11 avaient sélectionnées au moins une MR durant l'épisode de CVF (6 pour les INTI, 1 pour INNTI, 4 pour IP et 2 pour le Raltegravir), avec un taux de réussite du test génotypique de résistance par séquençage de l'ARN viral plasmatique de 71% pour les gènes de la transcriptase inverse et de

la protéase, et de 75% pour le gène de l'intégrase [117]. Taiwo *et al.* rapportent que 5/13 patients avaient sélectionnés au moins une MR (MR aux INTI ou INNTI) durant l'épisode de CVF comprises entre 100 et 200 copies/ml [104]. Parmi 171 patients présentant un épisode de CVF entre 50-1000 copies/ml (CV médiane à 101 copies/ml), Wirden *et al.* ont pu réaliser avec succès un test génotypique de résistance par séquençage de l'ARN viral plasmatique chez 60.2% des patients, et ont mis en évidence l'apparition de nouvelles MR chez 53% des patients ayant une CVF ≥ 200 copies/ml et 25% des patients ayant une CVF < 200 copies/ml [122]. Dans leur étude portant sur 212 patients présentant une CVF entre 50 et 1000 copies/ml (médiane de CV à 374 copies/ml), Gonzalez-Serna *et al.* ont montré l'émergence de MR parmi 19% des patients, principalement aux INTI et INNTI, avec un taux de réussite du test génotypique de résistance de 88% (68% en cas de CV < 200 copies/ml). Dans cette étude, les patients présentant une résistance aux ARV lors de la CVF avaient un risque 2 fois plus élevé d'EV que les patients n'ayant pas de résistance [119]. Swenson *et al.* ont également mis en évidence que l'émergence d'une résistance aux ARV durant un épisode de CVF entre 50 et 1000 copies/ml était associée à un risque plus élevé d'échec virologique, et ce y compris pour les CVF < 250 copies/ml [121].

La survenue d'une CVF entre 50 et 500 copies/ml doit faire envisager la réalisation d'un test génotypique de résistance, y compris pour les CVF50-200, et le traitement ARV devrait être optimisé en cas de mise en évidence de MR. Il faut toutefois souligner que la rentabilité de ce test sur une CV plasmatique < 500 copies/ml voire < 200 copies/ml est moindre que pour les CV ≥ 1000 copies/ml [5]. Un test génotypique de résistance par séquençage de l'ADN proviral des cellules mononuclées du sang périphérique peut se discuter en cas d'échec du test génotypique par séquençage de l'ARN plasmatique selon les recommandations du groupe résistance ANRS AC11 (<http://www.hivfrenchresistance.org>), tout en sachant qu'il existe des

discordances entre test génotypique de résistance sur ARN plasmatique et ADN proviral et que l'absence de mise en évidence de MR sur ADN proviral n'élimine pas leur existence [123,124].

Impact clinique des CVF

Dans notre étude menée dans ART-CC, aucune association n'a été mise en évidence entre la survenue d'une CVF (CVF50-200 ou CVF200-500) et la survenue d'un évènement classant SIDA ou d'un décès, en comparaison au groupe « pas de CVF ».

Si la CV est reconnue depuis longtemps comme un marqueur pronostique majeur de progression clinique de la maladie [125,126], il existe très peu de données dans la littérature sur l'impact des CVF < 500 copies/ml sur l'évolution clinique. Dans leur étude portant sur 6440 patients, Zhang *et al.* n'ont trouvé aucune association entre la survenue d'une CV entre 50 et 400 copies/ml (chez 2647 patients) et le risque d'évènements cliniques sévères non classant SIDA (maladie cardio-vasculaire sévère, cirrhose ou fibrose hépatique, insuffisance rénale chronique). Il faut souligner que dans plus de 75% des cas, ces épisodes de CV entre 50 et 400 copies/ml correspondaient à des blips (CV précédente et suivante < 50 copies/ml) [127].

L'absence d'association mise en évidence dans notre étude entre la survenue d'une CVF et la survenue d'un évènement classant SIDA ou d'un décès pourrait être due au faible nombre d'évènements cliniques et au fait que la majorité des patients ayant modifié leur traitement après la survenue d'un EV avait de nouveau une CV indétectable. De plus, le suivi médian clinique de nos patients n'était que de 3.1 ans, ce qui est probablement insuffisant pour démontrer un impact défavorable des CVF sur la morbidité classant ou non SIDA et la mortalité, par l'intermédiaire de la survenue d'un EV ou par d'autres mécanismes. Les CVF pourraient en effet être impliquées dans l'activation immune persistante et l'inflammation chronique chez les patients infectés par le VIH sous traitement ARV, ce qui pourrait contribuer à la mortalité et la

morbidité non-classant SIDA, notamment les évènements cardiovasculaires et les pathologies rénales [128-131]. Des études avec un temps de suivi prolongé sont nécessaires pour déterminer l'impact des CVF sur la morbidité et la mortalité chez les PVVIH. De plus, les CVF pourraient avoir un impact négatif sur la reconstitution du système immunitaire [132]. Les conséquences des CVF sur le plan immunologique restent toutefois mal connues, et nous projetons d'étudier parmi nos patients exposés ou non à la survenue d'une CVF l'évolution des taux et pourcentage de lymphocytes CD4 au cours du temps, ainsi que le ratio CD4/CD8 pendant la période des CVF, ce qui pourrait constituer une mesure indirecte de l'activation immune. Enfin, les CVF pourraient participer au réensemencement du réservoir viral latent, qui constitue un obstacle à l'éradication du VIH [87,133].

F. CONCLUSION

La survenue d'une CVF200-500 était significativement associée à un risque près de 4 fois plus élevé de survenue d'un EV ≥ 500 copies/ml, confirmant qu'une répllication virale persistante au-delà de 200 copies/ml doit être considérée et prise en charge comme un échec virologique avéré. Ce constat est en accord avec les recommandations actuelles aussi bien nationales qu'internationales [32,101].

La survenue d'une CVF50-200 était significativement associée à un risque plus de 2 fois plus élevé de survenue d'un EV ≥ 200 copies/ml dans 2 études de cohortes distinctes. Ce résultat était retrouvé quelle que soit la durée de la CVF, que les patients soient sous une première ligne de traitement ARV ou non et qu'ils soient sous trithérapie comportant un IP/r ou un INNTI.

Aucune association n'a été mise en évidence entre la survenue d'une CVF (CVF50-200 ou CVF200-500) et la survenue d'un évènement classant SIDA ou d'un décès, en comparaison au groupe « pas de CVF », avec toutefois un suivi médian de 3 ans, ce qui est probablement insuffisant pour démontrer un impact défavorable des CVF sur la morbidité classant ou non SIDA ou la mortalité.

Les recommandations pouvant découler de mes travaux concernant la prise en charge en cas de survenue d'une CV entre 50 et 200 copies/ml seraient, après un contrôle de la CV dans le mois pour confirmer l'existence d'une charge virale faible persistante entre 50 et 200 copies/ml, d'au minimum rapprocher la surveillance de la CV tous les 3 mois. Les résultats différents entre 2 études, qui manquent de données notamment sur l'observance et la résistance, ne nous permettent pas de recommander formellement une modification du régime thérapeutique devant toute CVF50-200.

En complément de mes résultats et d'après les données de la littérature, la prise en charge en cas de survenue de CVF50-200 justifie tout d'abord d'évaluer et de renforcer éventuellement l'observance du patient (en recherchant les facteurs pouvant être associés à une moins bonne observance comme la survenue d'effets indésirables ou un schéma posologique incompatible avec le rythme de vie du patient) et de vérifier l'absence de problèmes pharmacologiques (interactions médicamenteuses, malabsorption) en s'aidant des dosages pharmacologiques.

En l'absence de problèmes d'observance ou pharmacologique, la réalisation d'un test génotypique de résistance doit être considérée (séquençage de l'ADN proviral des cellules mononuclées du sang périphérique en cas d'échec du test génotypique par séquençage de l'ARN plasmatique) afin d'adapter le traitement ARV. En cas de MR mises en évidence, le traitement ARV doit être rapidement modifié en s'appuyant sur les données du test de résistance. Si le test de résistance échoue ou ne met pas en évidence de MR, une modification du traitement ARV du patient devrait être discutée, d'autant plus rapidement si le patient reçoit un traitement à faible barrière génétique (Lamivudine ou Emtricitabine, INNTI, Raltégravir, Elvitégravir) pour prévenir la sélection de MR. Si le choix se porte vers une non-modification du traitement, une surveillance rapprochée tous les 3 mois de la CV devrait être mise en place du fait du risque plus élevé d'EV, y compris sous traitement ARV comportant des IP/r.

BIBLIOGRAPHIE

1. Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, et al. (1998) Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 338: 853-860.
2. Hoen B, Bonnet F, Delaugerre C, Delobel P, Goujard C, et al. (2014) French 2013 guidelines for antiretroviral therapy of HIV-1 infection in adults. *J Int AIDS Soc* 17: 19034.
3. Delaugerre C, Ghosn J, Lacombe JM, Pialoux G, Cuzin L, et al. (2015) Significant reduction in HIV virologic failure during a 15-year period in a setting with free healthcare access. *Clin Infect Dis* 60: 463-472.
4. Schultze A, Phillips AN, Paredes R, Battegay M, Rockstroh JK, et al. (2015) HIV resistance testing and detected drug resistance in Europe. *AIDS* 29: 1379-1389.
5. Assoumou L, Descamps D, Yerly S, Dos Santos G, Marcelin AG, et al. (2013) Prevalence of HIV-1 drug resistance in treated patients with viral load >50 copies/mL in 2009: a French nationwide study. *J Antimicrob Chemother* 68: 1400-1405.
6. De Luca A, Dunn D, Zazzi M, Camacho R, Torti C, et al. (2013) Declining prevalence of HIV-1 drug resistance in antiretroviral treatment-exposed individuals in Western Europe. *J Infect Dis* 207: 1216-1220.
7. Lima VD, Gill VS, Yip B, Hogg RS, Montaner JS, et al. (2008) Increased resilience to the development of drug resistance with modern boosted protease inhibitor-based highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 198: 51-58.
8. Gill VS, Lima VD, Zhang W, Wynhoven B, Yip B, et al. (2010) Improved virological outcomes in British Columbia concomitant with decreasing incidence of HIV type 1 drug resistance detection. *Clin Infect Dis* 50: 98-105.
9. Masuhr A, Mueller M, Simon V, Zwingers T, Kurowski M, et al. (2002) Predictors of treatment failure during highly active antiretroviral therapy (racing trial). *Eur J Med Res* 7: 341-346.
10. Wittkop L, Gunthard HF, de Wolf F, Dunn D, Cozzi-Lepri A, et al. (2011) Effect of transmitted drug resistance on virological and immunological response to initial combination antiretroviral therapy for HIV (EuroCoord-CHAIN joint project): a European multicohort study. *Lancet Infect Dis* 11: 363-371.

11. Hogg RS, Bangsberg DR, Lima VD, Alexander C, Bonner S, et al. (2006) Emergence of drug resistance is associated with an increased risk of death among patients first starting HAART. *PLoS Med* 3: e356.
12. Palmer S, Kearney M, Maldarelli F, Halvas EK, Bixby CJ, et al. (2005) Multiple, linked human immunodeficiency virus type 1 drug resistance mutations in treatment-experienced patients are missed by standard genotype analysis. *J Clin Microbiol* 43: 406-413.
13. Wang C, Mitsuya Y, Gharizadeh B, Ronaghi M, Shafer RW (2007) Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: application to HIV-1 drug resistance. *Genome Res* 17: 1195-1201.
14. Cozzi-Lepri A, Noguera-Julian M, Di Giallonardo F, Schuurman R, Daumer M, et al. (2015) Low-frequency drug-resistant HIV-1 and risk of virological failure to first-line NNRTI-based ART: a multicohort European case-control study using centralized ultrasensitive 454 pyrosequencing. *J Antimicrob Chemother* 70: 930-940.
15. Lataillade M, Chiarella J, Yang R, Schnittman S, Wirtz V, et al. (2010) Prevalence and clinical significance of HIV drug resistance mutations by ultra-deep sequencing in antiretroviral-naïve subjects in the CASTLE study. *PLoS One* 5: e10952.
16. Nicot F, Saliou A, Raymond S, Saune K, Dubois M, et al. (2012) Minority variants associated with resistance to HIV-1 nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors during primary infection. *J Clin Virol* 55: 107-113.
17. Nicot F, Saune K, Raymond S, Jeanne N, Carcenac R, et al. (2015) Minority resistant HIV-1 variants and the response to first-line NNRTI therapy. *J Clin Virol* 62: 20-24.
18. Simen BB, Simons JF, Hullsiek KH, Novak RM, Macarthur RD, et al. (2009) Low-abundance drug-resistant viral variants in chronically HIV-infected, antiretroviral treatment-naïve patients significantly impact treatment outcomes. *J Infect Dis* 199: 693-701.
19. Le T, Chiarella J, Simen BB, Hanczaruk B, Egholm M, et al. (2009) Low-abundance HIV drug-resistant viral variants in treatment-experienced persons correlate with historical antiretroviral use. *PLoS One* 4: e6079.
20. Codoner FM, Pou C, Thielen A, Garcia F, Delgado R, et al. (2011) Added value of deep sequencing relative to population sequencing in heavily pre-treated HIV-1-infected subjects. *PLoS One* 6: e19461.
21. Varghese V, Shahriar R, Rhee SY, Liu T, Simen BB, et al. (2009) Minority variants associated with transmitted and acquired HIV-1 nonnucleoside reverse transcriptase

- inhibitor resistance: implications for the use of second-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J Acquir Immune Defic Syndr* 52: 309-315.
22. Lataillade M, Chiarella J, Yang R, DeGrosky M, Uy J, et al. (2012) Virologic failures on initial boosted-PI regimen infrequently possess low-level variants with major PI resistance mutations by ultra-deep sequencing. *PLoS One* 7: e30118.
 23. Fisher R, van Zyl GU, Travers SA, Kosakovsky Pond SL, Engelbrech S, et al. (2012) Deep sequencing reveals minor protease resistance mutations in patients failing a protease inhibitor regimen. *J Virol* 86: 6231-6237.
 24. Todesco E, Rodriguez C, Morand-Joubert L, Mercier-Darty M, Desire N, et al. (2015) Improved detection of resistance at failure to a tenofovir, emtricitabine and efavirenz regimen by ultradeep sequencing. *J Antimicrob Chemother* 70: 1503-1506.
 25. Li JZ, Kuritzkes DR (2013) Clinical implications of HIV-1 minority variants. *Clin Infect Dis* 56: 1667-1674.
 26. Cohen C (2009) Low-level viremia in HIV-1 infection: consequences and implications for switching to a new regimen. *HIV Clin Trials* 10: 116-124.
 27. Garcia-Gasco P, Maida I, Blanco F, Barreiro P, Martin-Carbonero L, et al. (2008) Episodes of low-level viral rebound in HIV-infected patients on antiretroviral therapy: frequency, predictors and outcome. *J Antimicrob Chemother* 61: 699-704.
 28. Greub G, Cozzi-Lepri A, Ledergerber B, Staszewski S, Perrin L, et al. (2002) Intermittent and sustained low-level HIV viral rebound in patients receiving potent antiretroviral therapy. *AIDS* 16: 1967-1969.
 29. Laprise C, de Pokomandy A, Baril JG, Dufresne S, Trottier H (2013) Virologic failure following persistent low-level viremia in a cohort of HIV-positive patients: results from 12 years of observation. *Clin Infect Dis* 57: 1489-1496.
 30. Ryscavage P, Kelly S, Li JZ, Harrigan PR, Taiwo B (2014) Significance and Clinical Management of Persistent Low-Level Viremia and Very-Low-Level Viremia in HIV-1-Infected Patients. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 3585-3598.
 31. Gunthard HF, Aberg JA, Eron JJ, Hoy JF, Telenti A, et al. (2014) Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2014 recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *JAMA* 312: 410-425.
 32. Prise en charge médicale des personnes vivant avec le VIH - Recommandations du groupe d'experts sous la direction du Pr Philippe Morlat et sous l'égide du CNS et de l'ANRS. Actualisation 2014 du rapport 2013. http://www.santegouv.fr/IMG/pdf/experts-vih_actualisations2014pdf.

33. Tam LW, Chui CK, Brumme CJ, Bangsberg DR, Montaner JS, et al. (2008) The relationship between resistance and adherence in drug-naïve individuals initiating HAART is specific to individual drug classes. *J Acquir Immune Defic Syndr* 49: 266-271.
34. Harrigan PR, Hogg RS, Dong WW, Yip B, Wynhoven B, et al. (2005) Predictors of HIV drug-resistance mutations in a large antiretroviral-naïve cohort initiating triple antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 191: 339-347.
35. Vercauteren J, Wensing AM, van de Vijver DA, Albert J, Balotta C, et al. (2009) Transmission of drug-resistant HIV-1 is stabilizing in Europe. *J Infect Dis* 200: 1503-1508.
36. Descamps D, Assoumou L, Chaix ML, Chaillon A, Pakianather S, et al. (2013) National sentinel surveillance of transmitted drug resistance in antiretroviral-naïve chronically HIV-infected patients in France over a decade: 2001-2011. *J Antimicrob Chemother* 68: 2626-2631.
37. Metzner KJ, Bonhoeffer S, Fischer M, Karanickolas R, Allers K, et al. (2003) Emergence of minor populations of human immunodeficiency virus type 1 carrying the M184V and L90M mutations in subjects undergoing structured treatment interruptions. *J Infect Dis* 188: 1433-1443.
38. Kearney M, Palmer S, Maldarelli F, Shao W, Polis MA, et al. (2008) Frequent polymorphism at drug resistance sites in HIV-1 protease and reverse transcriptase. *AIDS* 22: 497-501.
39. Johnson JA, Li JF, Wei X, Lipscomb J, Irlbeck D, et al. (2008) Minority HIV-1 drug resistance mutations are present in antiretroviral treatment-naïve populations and associate with reduced treatment efficacy. *PLoS Med* 5: e158.
40. Xiaobai Z, Xi C, Tian H, Williams AB, Wang H, et al. (2014) Prevalence of WHO transmitted drug resistance mutations by deep sequencing in antiretroviral-naïve subjects in Hunan Province, China. *PLoS One* 9: e98740.
41. Charpentier C, Lee GQ, Rodriguez C, Visseaux B, Storto A, et al. (2015) Highly frequent HIV-1 minority resistant variants at baseline of the ANRS 139 TRIO trial had a limited impact on virological response. *J Antimicrob Chemother* 70: 2090-2096.
42. Paredes R, Lalama CM, Ribaud HJ, Schackman BR, Shikuma C, et al. (2010) Pre-existing minority drug-resistant HIV-1 variants, adherence, and risk of antiretroviral treatment failure. *J Infect Dis* 201: 662-671.

43. Metzner KJ, Giulieri SG, Knoepfel SA, Rauch P, Burgisser P, et al. (2009) Minority quasispecies of drug-resistant HIV-1 that lead to early therapy failure in treatment-naïve and -adherent patients. *Clin Infect Dis* 48: 239-247.
44. Goodman DD, Zhou Y, Margot NA, McColl DJ, Zhong L, et al. (2011) Low level of the K103N HIV-1 above a threshold is associated with virological failure in treatment-naïve individuals undergoing efavirenz-containing therapy. *AIDS* 25: 325-333.
45. Pou C, Noguera-Julian M, Perez-Alvarez S, Garcia F, Delgado R, et al. (2014) Improved prediction of salvage antiretroviral therapy outcomes using ultrasensitive HIV-1 drug resistance testing. *Clin Infect Dis* 59: 578-588.
46. Li JZ, Paredes R, Ribaud HJ, Svarovskaia ES, Metzner KJ, et al. (2011) Low-frequency HIV-1 drug resistance mutations and risk of NNRTI-based antiretroviral treatment failure: a systematic review and pooled analysis. *JAMA* 305: 1327-1335.
47. Metzner KJ, Rauch P, von Wyl V, Leemann C, Grube C, et al. (2010) Efficient suppression of minority drug-resistant HIV type 1 (HIV-1) variants present at primary HIV-1 infection by ritonavir-boosted protease inhibitor-containing antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 201: 1063-1071.
48. Metzner KJ, Rauch P, Braun P, Knechten H, Ehret R, et al. (2011) Prevalence of key resistance mutations K65R, K103N, and M184V as minority HIV-1 variants in chronically HIV-1 infected, treatment-naïve patients. *J Clin Virol* 50: 156-161.
49. Jakobsen MR, Tolstrup M, Sogaard OS, Jorgensen LB, Gorry PR, et al. (2010) Transmission of HIV-1 drug-resistant variants: prevalence and effect on treatment outcome. *Clin Infect Dis* 50: 566-573.
50. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, et al. (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376-380.
51. Vandenbroucke I, Van Marck H, Verhasselt P, Thys K, Mostmans W, et al. (2011) Minor variant detection in amplicons using 454 massive parallel pyrosequencing: experiences and considerations for successful applications. *Biotechniques* 51: 167-177.
52. Johnson VA, Calvez V, Gunthard HF, Paredes R, Pillay D, et al. (2011) 2011 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top Antivir Med* 19: 156-164.
53. De Luca A, Cingolani A, Di Giambenedetto S, Trotta MP, Baldini F, et al. (2003) Variable prediction of antiretroviral treatment outcome by different systems for interpreting genotypic human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *J Infect Dis* 187: 1934-1943.

54. Metzner KJ, Rauch P, Walter H, Boesecke C, Zollner B, et al. (2005) Detection of minor populations of drug-resistant HIV-1 in acute seroconverters. *AIDS* 19: 1819-1825.
55. Peuchant O, Thiebaut R, Capdepon S, Lavignolle-Aurillac V, Neau D, et al. (2008) Transmission of HIV-1 minority-resistant variants and response to first-line antiretroviral therapy. *AIDS* 22: 1417-1423.
56. Jain V, Sucupira MC, Bacchetti P, Hartogensis W, Diaz RS, et al. (2011) Differential persistence of transmitted HIV-1 drug resistance mutation classes. *J Infect Dis* 203: 1174-1181.
57. Paredes R, Sagar M, Marconi VC, Hoh R, Martin JN, et al. (2009) In vivo fitness cost of the M184V mutation in multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 in the absence of lamivudine. *J Virol* 83: 2038-2043.
58. Li JZ, Paredes R, Ribaud HJ, Svarovskaia ES, Kozal MJ, et al. (2012) Relationship between minority nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutations, adherence, and the risk of virologic failure. *AIDS* 26: 185-192.
59. Halvas EK, Wiegand A, Boltz VF, Kearney M, Nissley D, et al. (2010) Low frequency nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor-resistant variants contribute to failure of efavirenz-containing regimens in treatment-experienced patients. *J Infect Dis* 201: 672-680.
60. Boltz VF, Zheng Y, Lockman S, Hong F, Halvas EK, et al. (2011) Role of low-frequency HIV-1 variants in failure of nevirapine-containing antiviral therapy in women previously exposed to single-dose nevirapine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 9202-9207.
61. Armenia D, Vandenbroucke I, Fabeni L, Van Marck H, Cento V, et al. (2012) Study of genotypic and phenotypic HIV-1 dynamics of integrase mutations during raltegravir treatment: a refined analysis by ultra-deep 454 pyrosequencing. *J Infect Dis* 205: 557-567.
62. Liu J, Miller MD, Danovich RM, Vandergrift N, Cai F, et al. (2011) Analysis of low-frequency mutations associated with drug resistance to raltegravir before antiretroviral treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 1114-1119.
63. Charpentier C, Laureillard D, Piketty C, Tisserand P, Batisse D, et al. (2010) High frequency of integrase Q148R minority variants in HIV-infected patients naive of integrase inhibitors. *AIDS* 24: 867-873.

64. Soulie C, Assoumou L, Darty M, Rodriguez C, Peytavin P, et al. (2015) Virological Factors Associated With Outcome of Dual MVC/RAL Therapy (ANRS-157 Trial). Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Seattle Abstract 564.
65. Archer J, Braverman MS, Taillon BE, Desany B, James I, et al. (2009) Detection of low-frequency pretherapy chemokine (CXC motif) receptor 4 (CXCR4)-using HIV-1 with ultra-deep pyrosequencing. *AIDS* 23: 1209-1218.
66. Swenson LC, Mo T, Dong WW, Zhong X, Woods CK, et al. (2011) Deep sequencing to infer HIV-1 co-receptor usage: application to three clinical trials of maraviroc in treatment-experienced patients. *J Infect Dis* 203: 237-245.
67. Swenson LC, Mo T, Dong WW, Zhong X, Woods CK, et al. (2011) Deep V3 sequencing for HIV type 1 tropism in treatment-naïve patients: a reanalysis of the MERIT trial of maraviroc. *Clin Infect Dis* 53: 732-742.
68. Kagan RM, Johnson EP, Siaw M, Biswas P, Chapman DS, et al. (2012) A genotypic test for HIV-1 tropism combining Sanger sequencing with ultradeep sequencing predicts virologic response in treatment-experienced patients. *PLoS One* 7: e46334.
69. Rodriguez C, Soulie C, Marcelin AG, Calvez V, Descamps D, et al. (2015) HIV-1 Coreceptor Usage Assessment by Ultra-Deep Pyrosequencing and Response to Maraviroc. *PLoS One* 10: e0127816.
70. Lambert-Niclot S, Flandre P, Valantin MA, Peytavin G, Sayon S, et al. (2012) Resistant minority species are rarely observed in patients on darunavir/ritonavir monotherapy. *J Antimicrob Chemother* 67: 1470-1474.
71. Tang MW, Shafer RW (2012) HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications. *Drugs* 72: e1-25.
72. Lima VD, Harrigan R, Bangsberg DR, Hogg RS, Gross R, et al. (2009) The combined effect of modern highly active antiretroviral therapy regimens and adherence on mortality over time. *J Acquir Immune Defic Syndr* 50: 529-536.
73. EACS European AIDS Clinical Society. European Guidelines for treatment of HIV infected adults in Europe. Version 6.1 (2012). <http://www.europeanaidscinicalsociety.org/images/stories/EACS-Pdf/EacsGuidelines-v6.1-2edition.pdf>.
74. Portman MD, Lacey CJ (2012) Apparent low-level HIV RNA viraemia related to sample processing time. *HIV Med* 13: 578-579.

75. Wan H, Seth A, Rainen L, Fernandes H (2010) Coamplification of HIV-1 proviral DNA and viral RNA in assays used for quantification of HIV-1 RNA. *J Clin Microbiol* 48: 2186-2190.
76. Kran AM, Jonassen TO, Sannes M, Jakobsen K, Lind A, et al. (2009) Overestimation of human immunodeficiency virus type 1 load caused by the presence of cells in plasma from plasma preparation tubes. *J Clin Microbiol* 47: 2170-2174.
77. Karasi JC, Dziezuk F, Quennery L, Forster S, Reischl U, et al. (2011) High correlation between the Roche COBAS(R) AmpliPrep/COBAS(R) TaqMan(R) HIV-1, v2.0 and the Abbott m2000 RealTime HIV-1 assays for quantification of viral load in HIV-1 B and non-B subtypes. *J Clin Virol* 52: 181-186.
78. Ruelle J, Debaisieux L, Vancutsem E, De Bel A, Delforge ML, et al. (2012) HIV-1 low-level viraemia assessed with 3 commercial real-time PCR assays show high variability. *BMC Infect Dis* 12: 100.
79. Sire JM, Vray M, Merzouk M, Plantier JC, Pavie J, et al. (2011) Comparative RNA quantification of HIV-1 group M and non-M with the Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 v2.0 and Abbott Real-Time HIV-1 PCR assays. *J Acquir Immune Defic Syndr* 56: 239-243.
80. Montaner JS, Richman DD, Hammer SM, International AS-USAAGP (2009) Poor agreement between 2 assays for measuring low levels of HIV-1 viral load. *Clin Infect Dis* 49: 1283-1284.
81. Gulick RM, Ribaud HJ, Shikuma CM, Lustgarten S, Squires KE, et al. (2004) Triple-nucleoside regimens versus efavirenz-containing regimens for the initial treatment of HIV-1 infection. *N Engl J Med* 350: 1850-1861.
82. Riddler SA, Haubrich R, DiRienzo AG, Peeples L, Powderly WG, et al. (2008) Class-sparing regimens for initial treatment of HIV-1 infection. *N Engl J Med* 358: 2095-2106.
83. Bierman WF, van Agtmael MA, Nijhuis M, Danner SA, Boucher CA (2009) HIV monotherapy with ritonavir-boosted protease inhibitors: a systematic review. *AIDS* 23: 279-291.
84. Calza L, Manfredi R (2012) Protease inhibitor monotherapy as maintenance regimen in patients with HIV infection. *Curr HIV Res* 10: 661-672.
85. Perez-Valero I, Arribas JR (2011) Protease inhibitor monotherapy. *Curr Opin Infect Dis* 24: 7-11.

86. McConnell MJ, Mier-Mota J, Flor-Parra F, Martinez-Fernandez FJ, Lopez-Cortes LF, et al. (2011) Improved viral suppression after treatment optimization in HIV-infected patients with persistent low-level viremia. *J Acquir Immune Defic Syndr* 58: 446-449.
87. Ramratnam B, Mittler JE, Zhang L, Boden D, Hurley A, et al. (2000) The decay of the latent reservoir of replication-competent HIV-1 is inversely correlated with the extent of residual viral replication during prolonged anti-retroviral therapy. *Nat Med* 6: 82-85.
88. Letendre S, Marquie-Beck J, Capparelli E, Best B, Clifford D, et al. (2008) Validation of the CNS Penetration-Effectiveness rank for quantifying antiretroviral penetration into the central nervous system. *Arch Neurol* 65: 65-70.
89. Hellmuth J, Valcour V, Spudich S (2015) CNS reservoirs for HIV: implications for eradication. *J Virus Erad* 1: 67-71.
90. Yukl SA, Gianella S, Sinclair E, Epling L, Li Q, et al. (2010) Differences in HIV burden and immune activation within the gut of HIV-positive patients receiving suppressive antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 202: 1553-1561.
91. Else LJ, Taylor S, Back DJ, Khoo SH (2011) Pharmacokinetics of antiretroviral drugs in anatomical sanctuary sites: the male and female genital tract. *Antivir Ther* 16: 1149-1167.
92. Bonora S, Nicastrì E, Calcagno A, Gonzalez de Requena D, D'Ettorre G, et al. (2009) Ultrasensitive assessment of residual HIV viraemia in HAART-treated patients with persistently undetectable plasma HIV-RNA: a cross-sectional evaluation. *J Med Virol* 81: 400-405.
93. Sarmati L, Parisi SG, Montano M, Andreis S, Scaggiante R, et al. (2012) Nevirapine use, prolonged antiretroviral therapy and high CD4 nadir values are strongly correlated with undetectable HIV-DNA and -RNA levels and CD4 cell gain. *J Antimicrob Chemother* 67: 2932-2938.
94. Haim-Boukobza S, Morand-Joubert L, Flandre P, Valin N, Fourati S, et al. (2011) Higher efficacy of nevirapine than efavirenz to achieve HIV-1 plasma viral load below 1 copy/ml. *AIDS* 25: 341-344.
95. Richman DD, Margolis DM, Delaney M, Greene WC, Hazuda D, et al. (2009) The challenge of finding a cure for HIV infection. *Science* 323: 1304-1307.
96. Shen L, Siliciano RF (2008) Viral reservoirs, residual viremia, and the potential of highly active antiretroviral therapy to eradicate HIV infection. *J Allergy Clin Immunol* 122: 22-28.

97. Tobin NH, Learn GH, Holte SE, Wang Y, Melvin AJ, et al. (2005) Evidence that low-level viremias during effective highly active antiretroviral therapy result from two processes: expression of archival virus and replication of virus. *J Virol* 79: 9625-9634.
98. Gandhi RT, Zheng L, Bosch RJ, Chan ES, Margolis DM, et al. (2010) The effect of raltegravir intensification on low-level residual viremia in HIV-infected patients on antiretroviral therapy: a randomized controlled trial. *PLoS Med* 7.
99. Havlir DV, Bassett R, Levitan D, Gilbert P, Tebas P, et al. (2001) Prevalence and predictive value of intermittent viremia with combination hiv therapy. *Jama* 286: 171-179.
100. Karlsson AC, Younger SR, Martin JN, Grossman Z, Sinclair E, et al. (2004) Immunologic and virologic evolution during periods of intermittent and persistent low-level viremia. *AIDS* 18: 981-989.
101. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services (2015).
<http://www.aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adultandadolescentgl.pdf>.
102. May MT, Ingle SM, Costagliola D, Justice AC, de Wolf F, et al. (2013) Cohort profile: Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration (ART-CC). *Int J Epidemiol*.
103. Doyle T, Geretti AM (2012) Low-level viraemia on HAART: significance and management. *Curr Opin Infect Dis* 25: 17-25.
104. Taiwo B, Gallien S, Aga E, Ribaud H, Haubrich R, et al. (2011) Antiretroviral drug resistance in HIV-1-infected patients experiencing persistent low-level viremia during first-line therapy. *J Infect Dis* 204: 515-520.
105. Vancoillie L, Demecheleer E, Callens S, Vogelaers D, Vandekerckhove L, et al. (2014) Markers associated with persisting low-level viraemia under antiretroviral therapy in HIV-1 infection. *J Antimicrob Chemother* 69: 1098-1103.
106. Wiesmann F, Braun P, Knickmann M, Knechten H (2014) Low level HIV viremia is more frequent under protease-inhibitor containing firstline therapy than under NNRTI-regimens. *J Int AIDS Soc* 17: 19828.
107. Martin-Blondel G, Saune K, Vu Hai V, Marchou B, Delobel P, et al. (2012) Factors associated with a strictly undetectable viral load in HIV-1-infected patients. *HIV Med* 13: 568-573.
108. Floridia M, Giuliano M, Palmisano L, Vella S (2008) Gender differences in the treatment of HIV infection. *Pharmacol Res* 58: 173-182.

109. Sungkanuparph S, Groger RK, Overton ET, Fraser VJ, Powderly WG (2006) Persistent low-level viraemia and virological failure in HIV-1-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy. *HIV Med* 7: 437-441.
110. Boillat-Blanco N, Darling KE, Schoni-Affolter F, Vuichard D, Rougemont M, et al. (2014) Virological outcome and management of persistent low-level viraemia in HIV-1-infected patients: 11 years of the Swiss HIV Cohort Study. *Antivir Ther*.
111. Geretti AM, Smith C, Haberl A, Garcia-Diaz A, Nebbia G, et al. (2008) Determinants of virological failure after successful viral load suppression in first-line highly active antiretroviral therapy. *Antivir Ther* 13: 927-936.
112. Wirden M, Todesco E, Valantin MA, Lambert-Niclot S, Simon A, et al. (2015) Low-level HIV-1 viraemia in patients on HAART: risk factors and management in clinical practice. *J Antimicrob Chemother* 70: 2347-2353.
113. Murri R, Lepri AC, Phillips AN, Girardi E, Nasti G, et al. (2003) Access to antiretroviral treatment, incidence of sustained therapy interruptions, and risk of clinical events according to sex: evidence from the I.Co.N.A. Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 34: 184-190.
114. Nicastrì E, Leone S, Angeletti C, Palmisano L, Sarmati L, et al. (2007) Sex issues in HIV-1-infected persons during highly active antiretroviral therapy: a systematic review. *J Antimicrob Chemother* 60: 724-732.
115. Grabar S, Kousignian I, Sobel A, Le Bras P, Gasnault J, et al. (2004) Immunologic and clinical responses to highly active antiretroviral therapy over 50 years of age. Results from the French Hospital Database on HIV. *AIDS* 18: 2029-2038.
116. Grabar S, Weiss L, Costagliola D (2006) HIV infection in older patients in the HAART era. *J Antimicrob Chemother* 57: 4-7.
117. Delaugerre C, Gallien S, Flandre P, Mathez D, Amarsy R, et al. (2012) Impact of low-level-viremia on HIV-1 drug-resistance evolution among antiretroviral treated-patients. *PLoS One* 7: e36673.
118. Gallien S, Delaugerre C, Charreau I, Braun J, Boulet T, et al. (2011) Emerging integrase inhibitor resistance mutations in raltegravir-treated HIV-1-infected patients with low-level viremia. *AIDS* 25: 665-669.
119. Gonzalez-Serna A, Min JE, Woods C, Chan D, Lima VD, et al. (2014) Performance of HIV-1 Drug Resistance Testing at Low-Level Viremia and Its Ability to Predict Future Virologic Outcomes and Viral Evolution in Treatment-Naive Individuals. *Clin Infect Dis* 58: 1165-1173.

120. Li JZ, Gallien S, Do TD, Martin JN, Deeks S, et al. (2012) Prevalence and significance of HIV-1 drug resistance mutations among patients on antiretroviral therapy with detectable low-level viremia. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 5998-6000.
121. Swenson LC, Min JE, Woods CK, Cai E, Li JZ, et al. (2014) HIV drug resistance detected during low-level viraemia is associated with subsequent virologic failure. *AIDS*.
122. Wirden M, Todesco E, Valantin MA, Lambert-Niclot S, Simon A, et al. (2015) Low-level HIV-1 viraemia in patients on HAART: risk factors and management in clinical practice. *J Antimicrob Chemother*.
123. Delaugerre C, Braun J, Charreau I, Delarue S, Nere ML, et al. (2012) Comparison of resistance mutation patterns in historical plasma HIV RNA genotypes with those in current proviral HIV DNA genotypes among extensively treated patients with suppressed replication. *HIV Med* 13: 517-525.
124. Wirden M, Soulie C, Valantin MA, Fourati S, Simon A, et al. (2011) Historical HIV-RNA resistance test results are more informative than proviral DNA genotyping in cases of suppressed or residual viraemia. *J Antimicrob Chemother* 66: 709-712.
125. Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, Margolick JB, Tassoni CJ, et al. (1997) Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* 126: 946-954.
126. Thiebaut R, Morlat P, Jacqmin-Gadda H, Neau D, Mercie P, et al. (2000) Clinical progression of HIV-1 infection according to the viral response during the first year of antiretroviral treatment. *Groupe d'Epidemiologie du SIDA en Aquitaine (GECSA). AIDS* 14: 971-978.
127. Zhang S, van Sighem A, Kesselring A, Gras L, Smit C, et al. (2012) Episodes of HIV viremia and the risk of non-AIDS diseases in patients on suppressive antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 60: 265-272.
128. Hsue PY, Deeks SG, Hunt PW (2012) Immunologic basis of cardiovascular disease in HIV-infected adults. *J Infect Dis* 205 Suppl 3: S375-382.
129. Hunt PW (2012) HIV and inflammation: mechanisms and consequences. *Curr HIV/AIDS Rep* 9: 139-147.
130. Justice AC, Freiberg MS, Tracy R, Kuller L, Tate JP, et al. (2012) Does an index composed of clinical data reflect effects of inflammation, coagulation, and monocyte activation on mortality among those aging with HIV? *Clin Infect Dis* 54: 984-994.

131. Tien PC, Choi AI, Zolopa AR, Benson C, Tracy R, et al. (2010) Inflammation and mortality in HIV-infected adults: analysis of the FRAM study cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr* 55: 316-322.
132. Corbeau P, Reynes J (2011) Immune reconstitution under antiretroviral therapy: the new challenge in HIV-1 infection. *Blood* 117: 5582-5590.
133. Jones LE, Perelson AS (2007) Transient viremia, plasma viral load, and reservoir replenishment in HIV-infected patients on antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 45: 483-493.